

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



557607



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/103065 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 1/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000297
- (22) 国際出願日: 2004 年 1 月 16 日 (16.01.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-144406 2003 年 5 月 22 日 (22.05.2003) JP
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 橋本 文雄 (HASHIMOTO, Fumio) [JP/JP];
〒8900081 鹿児島県鹿児島市唐湊三丁目31-1-2-6
Kagoshima (JP). 坂田 祐介 (SAKATA, Yusuke) [JP/JP];
〒8900053 鹿児島県鹿児島市中央町5-12-902
Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 磯野 道造 (ISONO, Michizo); 〒1020093 東京
都千代田区平河町2丁目7番4号 砂防会館別館内磯野
国際特許商標事務所気付 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CROSSING FLOWER COLOR GENOTYPES

(54) 発明の名称: 花きの花色遺伝型交配法

(57) Abstract: It is intended to clarify heredity of the biosynthesis of flower pigments and the relationship between flower color heredities and pigment genotypes, thereby providing a method of crossing flower color genotypes which is practically available in creating a novel flower color. There is found out a novel rule that flower color genotypes relate to the biosynthesis of flavonoids represented by the pathway (I) and the heredities of flavonoid 3'-hydroxylase (F3' H) and flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5' H) are controlled by 5 multiple alleles. As a result, it becomes possible to provide a method of producing a novel flower color with the use of genotypes D/d·E/e·H^xH^x·Pg/pg·Cy/cy·Dp/dp by which flower colors can be freely created based on flower pigment genotypes without resort to gene recombination or mutation caused by exposure to radiation, etc.

(57) 要約: 本発明は、花色素生合成の遺伝を明らかにし、花きの花色遺伝と色素遺伝子型の関係を明らかにし、花きの新花色作出について実用的な花色遺伝型交配法を提供するものであり、花色遺伝型が経路式 (I) のフラボノイド生合成に関与し、フラボノイド 3'-ヒドロキシラーゼ (F3' H) やフラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ (F3',5' H) の遺伝が五つの複対立遺伝子によって制御されているという新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、放射線等照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、花きの色素遺伝子型からその花色を自由に創成できる、遺伝子型 D/d · E/e · H^xH^x · Pg/pg · Cy/cy · Dp/dp を用い、新花色を作出する方法である。

WO 2004/103065 A1

明細書

花きの花色遺伝型交配法

5 産業上の利用分野

本発明は、花色遺伝型を適用した花きの新花色育種法に関する。より詳しくは、開花植物、すなわち、被子植物 (angiosperms) の花と、遺伝子形を改変するための処理である交配の方法とからなる新規植物またはそれらを得るための処理に関するものである。また、生殖交雑 (sexual hybridization) の段階を含む育種 (breeding) によって得られた植物

10 やその一部を用いる方法である。また、新規植物 (new plants) またはそれらを得るための方法であって、被子植物 (angiosperms) などの花き類 (flowering plants)、特に花 (flowers) に関する。

15

背景技術

アントシアニン類 (anthocyanins) はフラボノイド化合物 (flavonoids) の一種であり、植物の花、果実、葉などに広く存在し、赤、紫、青などの呈色に関係する色素配糖体 (pigment glycosides)

20 s) である。アントシアニン類 (anthocyanins) を塩酸で加水分解 (hydrolysis) すると、糖部 (sugars) とアグリコン部 (aglycone) であるアントシアニジン (anthocyanidin) に分解される (非特許文献1、村上孝夫：天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月：170-172)。

25 フラボノール配糖体 (flavonol glycosides) 類はフラボノイド化合物 (flavonoids) の一種であり、植物の花、果実、葉葉などに広く存在し、黄色に呈色する色素配糖体 (pigment glycosides) である。フラボノール配糖体類 (flavonol glycosides) を塩酸で加水分解 (hydrolysis) すると、糖部 (sugars)

とアグリコン部 (aglycone) であるフラボノール (flavonol) に分解される (非特許文献2、村上孝夫：天然物の構造と化学、廣川書店、1984年9月：155-185)。

アントシアニジン (anthocyanidin) 類は、植物の花において、
5 フラバノン (flavanone) であるナリンゲニン (naringenin) を出発物質として生合成される。即ち、まずフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'、5'HまたはF3'H) の作用によりフラバノン骨格 (flavanone skeleton) のB環 (B-ring) に水酸基 (hydroxyl group) が更
10 に1個結合したエリオディクチオール (eriodictyol)、更に2個結合したペンタヒドロキシフラバノン (pentahydroxyflavanone) へ酵素変換されることが知られている。また、出発物質であるナリンゲニン (naringenin) が、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (flavonoid 3'-hydroxylase, F3H) の作用を受けジヒドロケ
15 ンフェロール (dihydrokaempferol) へ酵素変換され、これが基質となって、更にフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3'H) の作用を受け、B環に水酸基が更に1個結合したジヒドロクエルセチン (dihydroquercetin)、更に2個結合したジヒドロミリセチン (dihydromyricetin) へ酵素変換されることが知られている。この3種のジヒ
20 ドロフラボノール (dihydrokaempferol、dihydroquercetin、dihydromyricetin) がジヒドロフラボノールリダクターゼ (dihydroflavonol reductase, DFR) およびアントシアニジンシンターゼ (anthocyanidin synthase, AS) の作用を受けて、それぞれペラルゴニジン (pelargonidin, Pgn)、シアニジン (cyanidin, Cyn)、デルフィニジン (delphinidin, Dpn) へ酵素変換されることが知られている (非特許
25 文献2)。

アントシアニジン (anthocyanidin) 類は、B環の水酸基が異なることでその呈色が決定される。例えば、一般に花色素 (flower pig

ment)で化学構造(chemical structure)中、B環の4'位(4' position)に水酸基が一個有るものはペラルゴニジン(Pgn)でオレンジ色～朱赤色を呈し、B環の3'、4'位に水酸基が二個有るものはシアニジン(Cyn)で赤色～深紅色を呈し、B環の3'、4'、5'位に水酸基が三個有るものはデルフィニジン(Dpn)で赤紫色～紫色を呈し、これらが共存することによって様々な花色を発現する(非特許文献3、本多利雄他:現代化学、1998年5月:25-32)。

これらの他、種々のアシル基(acylated groups)の結合したアントシアニン類(anthocyanin)も多数報告され、これらが分子間で互いにスタッキングして花色が変調する現象(分子間自己会合作用、intermolecular stacking)、他の黄色フラボノイド配糖体(flavonoid glycosides)類とサンドイッチ状にスタッキングして花色が変調(青色化、blueing)する現象(分子間コピグメント作用、intermolecular copigmentation)、金属原子と結合することによって花色が変調(青色化、blueing)する現象(金属錯体イオン形成作用、metal-complexation)、分子中のアシル基(acylated group)等が分子内でスタッキングして花色が変調(青色化、blueing)する現象(分子内コピグメント作用、intramolecular copigmentation)、並びに細胞液胞内pHが変化する現象などで花色が決定されることが認められている(非特許文献4、Goto, T. et al.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30:17-33, 1991)。

植物の花色遺伝は、花色自体(赤、青、黄、紫など)を遺伝子型(genotype)として捉えたものが多く報告されている(非特許文献5、安田 齊:花色の生理・生化学、内田老鶴圃、1993年3月:P. 219-272)。近年、フラボノイド色素(flavonoid pigments)に関する花色遺伝型の解析が試みられているが、これらはビール(Beale, 1945)の唱えた1遺伝子-1酵素説(one gene-one enzyme theory)に基づくものである。その例として、ゼラニウム(Pelargonium

x hortorum) 花卉のアントシアニン生合成 (anthocyanidin biosynthesis) における、ジヒドロフラボノールリダクターゼ (DFR) およびアントシアニンシンターゼ (AS) の酵素系をそれぞれ E_1/e_1 および E_2/e_2 と表記し、遺伝子型 (genotype) を想定した方法がある (非特許文献6、小林加奈：育種学雑誌、48:169-176、1998)。また、ツツジでは、花卉中のフラボノイド生合成前駆体レベルでの各酵素系を遺伝子型として想定した方法があるが、ツツジ以外の花きには適用できなかったなどの問題点がある (非特許文献7、Heurssel, J. と Horn, W.: Z. Pflanzenzüchtg, 79:238249、1977)。

また、ペチュニア (Petunia) の花では、 Ht_1 と Ht_2 の2遺伝子 (gene) がフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ ($F3' H$) を、 Hf_1 と Hf_2 の2遺伝子がフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ ($F3'$ 、 $5' H$) を制御すると報告されている (非特許文献8、Holton, T. A. et al.: The Plant Cell, 7:1071-1083、1995)。

更に、ペチュニアの花では、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ ($F3' H$) とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ ($F3'$ 、 $5' H$) のB環の水酸化が二遺伝子支配を受けているとの記載がある (非特許文献9、Holton, T. A. et al.: Nature, 366:276279、1993)。本発明による花色遺伝型交配法では、一遺伝子の支配下にある五つの複対立遺伝子 (multiple allele) で花色が制御されていることが特徴で、花きの花色素遺伝は、二遺伝子支配としては同定できなかった。

更にまた、ペチュニアの花では、遺伝子レベルでそれぞれの2遺伝子座が (Ht_1 、 Ht_2 はフラボノイドB環の3'位の水酸化に関与し、 Hf_1 、 Hf_2 はフラボノイドB環の5'位の水酸化に) 関与する事実を明らかにしたものの、色素遺伝子型 (pigment genotype) として後代にどのような花色が遺伝するのか、必ずしも色素遺伝子型 (pigment genotype) と花色の遺伝に相関性が認められなかったなどの問題点がある (非特許文献10、Griesbach, R. J.: J. Heredit., 87:241-245、1996)。

花色は、光が花卉表面にあたり、花卉表皮細胞内に存在する色素類 (pigments) に吸収されなかった光が反射されることにより、人間の目に感知される。しかし、光、または色彩 (chroma) に対する感受性に個人差があるために、花色を明確に表現する手法が必要であるとされてきた (非特許文献11、
5 Voss, D. H.: Hort Sci., 27: 1256-1260, 1992)。

花色 (flower color) は、色彩計、または、色差計 (colorimeter) によるCIE Lab表色系 (CIE Lab color coordinate system) を用いた測定方法が主流となってきた。これは、色の三属性 (color attribute)、すなわち、色相 (hue)、明
10 度 (lightness)、彩度 (chromaまたはbrightness) を三次元の立体空間座標系 (three dimensional global color chart)、つまり、色立体として考えたもので、本空間中の色差 (hue difference) は、肉眼で感知した色の差を正確に反映する (非特許文献12、Gonnet, J. F.: Food Chem., 63:
15 409-415, 1998)。したがって、花色を測定、つまり測色して、花卉などの表皮細胞中の内生色素との関係を求める場合には、花色との関係をより正確に求めることができるなどの報告がある (非特許文献13、Hashimoto, F. et al.: J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 69: 428-434, 2000; 非特許文献14、Hashimoto, F. et al.:
20 Biosci. Biotechnol. Biochem., 66: 1652-1659, 2002)。

その他、特開平5-184370号 (以下、特許文献1という) に、フラボノイド水酸化酵素遺伝子 (特許文献1の第0001~0002段落) の記載がある。

「フラボノイド3'、5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしている
25 DNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片が提供される。このDNA鎖を目的植物に導入することにより、新しい色彩を有した品種を作出することができる。また本発明は、上記のDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片を含有している組換えベクターにも関する」という記載がある (特許文献1の第0004段落)。

特開平10-113184号 (以下、特許文献2という) には、フラボノイド

配糖化酵素遺伝子（特許文献2の第0001～0008段落）の記載がある。「リンドウの花弁よりUDP-グルコース：フラボノイド3，5-O-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、その配列決定をすることに成功し」、「ゲンチオデルフィン生合成遺伝子のうち、3位，5位の2位を配糖化しうる糖転移酵素遺伝子を提供することにある。」という記載がある（特許文献2の第0005段落）。

特開平11-509733号（以下、特許文献3という）には、植物における遺伝子発現調節のための組成物及び方法に関する特許請求の範囲1～15の記載がある。

- 10 第26回国際園芸学会議（トロント、カナダ）の講演要旨には、トルコギキョウ花弁中の3種の主要アントシアニジンの遺伝の記載がある（非特許文献15、Uddin, A. F. M. J. et al.: the XXVIth International Horticultural Congress and Exhibition, August 1117:475476, 2000
- 15 2）。この内容を、特願2003026598号（以下、特許文献4という）として出願し、トルコギキョウの花色遺伝型交配法（特許文献4の第0001～0019段落）と記載した。「トルコギキョウの主要花色素である、3つのアントシアニン（anthocyanidin）：ペラルゴニン（pelargonidin, Pgn）、シアニン（cyanidin, Cyn）、デルフィニン（delphinidin, Dpn）の遺伝に着目し、自殖（self-pollination）や正逆交雑を行い検討した結果、F₁～F₃世代（progenies）の色素表現型（pigment phenotype）の分離から、新しい遺伝の法則を見出した。」「色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ（F3' H）とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ（F3'、5' H）の酵素反応系には、H^T、H^F、H^D、H^Oの4つの複対立遺伝子（multiple allele）が存在し、これらが3'位の水酸化、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、および3'位と3'、5'位の水酸化を制御し、」という記載がある。
- 20
- 25

US6080920号（以下、特許文献5という）には、花色変異（alte

red flower color)を起こさせた植物とその作出方法の記載がある。「本発明は、遺伝子改変植物 (transgenic plants) を作出する新しい方法であって、花色変異 (altered flower color) を起こさせるものである。より詳しくは、遺伝子改変カーネーション (transgenic carnation plants) を作出する方法であって、自然のカーネーションにはない花色を表現できる方法である。」という記載がある。

DE 19918365号 (以下、特許文献6という) には、フラボン生合成酵素 II (flavone synthase II、FNS II) をコードする核酸 (nucleic acid) を用いて花色変異 (altered flower color) させた遺伝子改変植物 (transgenic plants) の作出方法の記載がある。「フラボン生合成酵素 II (flavone synthase II、FNS II) をコードする核酸 (nucleic acid) であって、(i) 1697塩基配列 (base pair (bp) sequence) (1) であるもの、あるいは、その断片 (fragments)、(ii) 配列 (sequence) が (1) へ混成 (hybridize) するもの、または、あるいは、それと少なくとも40%の相同性 (homology) を有するもので、かつ、FNS II活性を有するタンパク (protein) あるいはポリペプチド (polypeptide) をコードし、または (iii) (i) あるいは (ii) と遺伝的に同等 (genetic equivalent) である核酸。」、「(5) (I) または (Ia) を含む遺伝子改変植物 (transgenic plants) であって、さらに、花色変異 (altered flower color) を起こした遺伝子改変植物 (transgenic plants) の作出方法に関する。」という記載がある)。

25 このように、複対立遺伝子 (multiple allele) については、その全容がまだ解明される必要があった。また、四つの複対立遺伝子 (multiple allele) の存在を明らかにできたものの、遺伝される花色 (flower color) との関係についての記載はなく、複対立遺伝子 (multiple allele) の存在をすべて明らかにすると共に、花色 (fl

ower color) との関係をも明らかにする必要があった。

しかしながら、花色自体の遺伝子型育種法では後代花色の分離に曖昧なところが多く、実用化することに沢山の問題点を残した。また、非特許文献6に記載のある、 E_1/e_1 および E_2/e_2 で表されたゼラニウム (Pelargonium x hortorum) 花色素の遺伝についても、後代の分離比に疑問点があり、実用化には至らなかった。特許文献においては、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせなければ、新花色を作出することができないという問題がある。

さらに、遺伝した個体がどのような花色を有するか予測することが困難であって、その花色も肉眼による曖昧な色であり、問題がある。また、トルコギキョウではできたもののすべての花きに適用できるかどうか、CIELab表色系 (CIE Lab color coordinate system) などを用いて花色 (flower color) を正確に測色・数値化し、遺伝させることが十分ではなかったという問題点もある。

本発明は、花色素生合成の遺伝を明らかにし、花きの花色をCIELab表色系 (CIE Lab color coordinate system) などを用いて花色 (flower color) を正確に測色・数値化した上で、その色素遺伝子型 (pigment genotype) と花色遺伝の関係を明らかにし、花きの新花色作出について実用的花色遺伝型交配法を提供するものである。

なお、全ての非特許文献及び非特許文献 (すなわち、非特許文献1～15及び特許文献1～6) は、参考文献として本明細書に組み込まれる。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために、フラボノイド生合成のB環の水酸化に関するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3' H) やフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ (F3'、5' H)、などの遺伝に着目し、その遺伝の分離を調べた結果、ペラルゴニジン (Pg n)、シアニジン (Cy n)、デルフィニジン (Dp n) の生合成に関与するジヒドロフラボノールリダクターゼ (DFR) およびアントシアニンシンターゼ (AS) の酵素系の遺伝が、それ

5 ぞれPg/pg、Cy/cy、Dp/dpの遺伝子 (gene) によって制御されていることと併せて、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3' H) やフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ (F3'、5' H) の遺伝が五つの複対立遺伝子 (multiple allele) によって制御されているという
新しい法則を見出し、結果として、遺伝子組み替え、放射線等照射などによる突然変異を起こさせる方法を用いなくても、花きの色素遺伝子型 (pigment genotype) からその花色を自由に創成できる。

すなわち、本発明は、花きの主要花色素である、3つのアントシアニジン (anthocyanidins): ペラルゴニジン (Pgn)、シアニジン (Cyn)、
10 デルフィニジン (Dpn) の遺伝に着目し、自殖や正逆交雑を行い検討した結果、F₁~F₄世代の色素表現型の分離から、遺伝の新しい法則を見出した。また、PgnとDpn色素型 (pigment phenotype) について、PgnとDpn色素は共存しないで、両者はそれぞれ単独型として認められるか、または、Cyn色素を伴うことで遺伝することを見出した。後代実生 (progenies)
15 ies) の分離とカイ二乗検定の結果、Pgn、Cyn、およびDpn色素の遺伝にはフラボノイド生合成におけるアントシアニジン生合成レベルで、Pg/pg、Cy/cy、Dp/dpとして示される遺伝子座 (gene loci) が、それぞれに存在することを見出した。

さらに、色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ (F3' H) とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ (F3'、5' H) の酵素反応系には、H^T、H^F、H^D、H^Z、H^Oの5つの複対立遺伝子 (multiple allele) が存在し、これらが3'位の水酸化、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、および3'位と3'、5'位の水酸化を制御し、これらの組合せによって色素表現型と花色表現型が決定されることを見出し、本発明を完成した。
25

本発明の花色遺伝型交配法は、花きの花色発現に関わる主要アントシアニジン色素のペラルゴニジン (Pgn)、シアニジン (Cyn)、デルフィニジン (Dpn) の遺伝であって、遺伝子型H^xH^x・Pg/pg・Cy/cy・Dp/dpを用い、新花色を作出するものである。

本発明の花色素遺伝型交配法は、花きの花色、植物の果色、葉の色がフラボノイド生合成過程で遺伝するものに適用することができる。即ち、花きの花色素発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン (P g n)、シアニン (C y n)、デルフィニン (D p n) の遺伝並びに花形に関わる八重型、覆輪型の

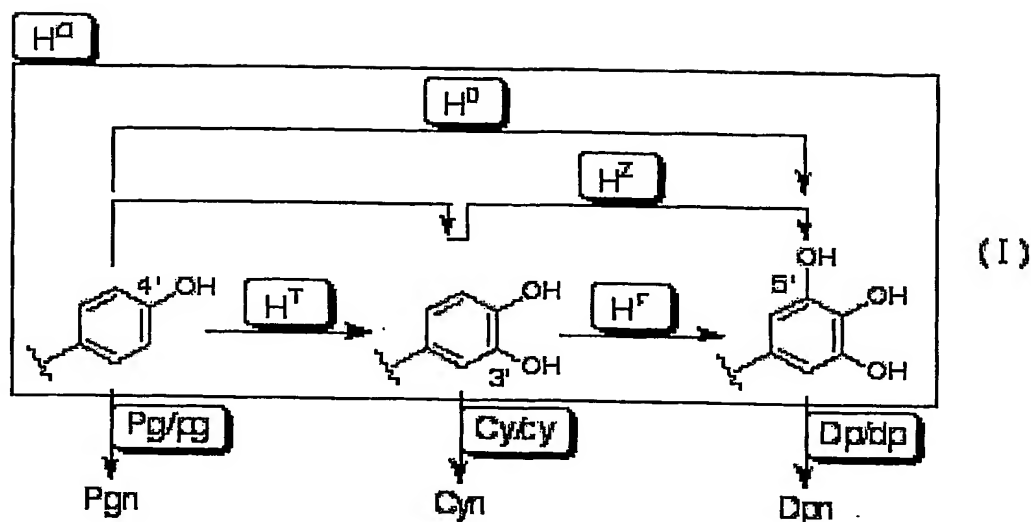
5 遺伝であって、遺伝子型 $D/d \cdot E/e \cdot H^x H^x \cdot P g/p g \cdot C y/c y \cdot D p/d p$ を用い、新花色を作出する花色素遺伝型交配法である。花きの花色素発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン (P g n)、シアニン (C y n)、デルフィニン (D p n) の遺伝について、P g n、C y n、D p n 色素の遺伝子座をそれぞれ $P g/p g$ 、 $C y/c y$ 、 $D p/d p$ として示し、フラ

10 ボノイド色素前駆体のB環の水酸化に関与するフラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ ($F 3' H$) とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ ($F 3'、5' H$) の酵素反応系の遺伝子型を、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O の5つの複対立遺伝子で示し、 $P g/p g$ の記号の内二つを選択し ($P g P g$ 、 $P g p g$ 、 $p g p g$ の組合せ記号の内一つを選択し)、 $C y/c y$ の記号の内二つを選択し ($C y c y$ 、 $C y c y$ 、 $c y c y$ の組合せ記号の内一つを選択し)、 $D p/d p$ の記号の内二つを選択し ($D p D p$ 、 $D p d p$ 、 $d p d p$ の組合せ記号の内一つを選択し)、

15 また、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O の記号の内二つを選択し ($H^T H^T$ 、 $H^T H^F$ 、 $H^T H^D$ 、 $H^T H^Z$ 、 $H^T H^O$ 、 $H^F H^F$ 、 $H^D H^F$ 、 $H^Z H^F$ 、 $H^O H^F$ 、 $H^D H^D$ 、 $H^D H^Z$ 、 $H^D H^O$ 、 $H^Z H^Z$ 、 $H^Z H^O$ 、 $H^O H^O$ の組合せ記号の内一つを選択し)、すなわち、

20 遺伝子型 (genotype) $D/d \cdot E/e \cdot H^x H^x \cdot P g/p g \cdot C y/c y \cdot D p/d p$ である方法を用いた新花色を創成する花色素遺伝型交配法である。

本発明の花色素遺伝型交配法は、花色素遺伝型が経路式 (I) :



(ここで、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O は、フラボノイド生合成の前駆物質でのB環の水酸化に関する複対立遺伝子を表す。 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O の5つの複対立遺伝子は、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ ($F3'H$) とフラボノイド3'、5'-ヒドロキシラーゼ ($F3',5'H$) の、それぞれ3'位の水酸化、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、および3'位と3'、5'位の水酸化を制御する。この5つの複対立遺伝子の表記方法は、例えば、T、F、D、Z、Oなど他の表記法でもよい。Pg/pg、Cy/cy およびDp/dpは、Pgn、Cyn、Dpnの生合成に参与するジヒドロフラボノールリダクターゼ (DFR)、あるいはアントシアニンシンターゼ (AS) の発現に対立する遺伝子座 (gene loci) がそれぞれに存在することを示し、D/dは八重の花冠形質、E/eは覆輪の花冠形質を示す。)

のフラボノイド生合成に参与し、遺伝するものも含まれる。

本発明の花冠遺伝型交配法は、花きの花色が母性遺伝する前記の方法である。

より詳しくは、本発明の花冠遺伝型交配法は、花きの花色が母性遺伝し、花きの花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン (Pgn)、シアニン (Cyn)、デルフィニン (Dpn) の遺伝並びに花形に関わる八重型、覆輪型の遺伝であって、遺伝子型 (genotype) $D/d \cdot E/e \cdot H^x H^x \cdot Pg/pg \cdot Cy/cy \cdot Dp/dp$ を用い、新花色を作出する花冠遺伝型交配法である。

本発明の早見表は、花色を作出する花色遺伝型交配の組み合わせを決定するものであって、花粉親の配偶子を行とし、種子親の配偶子を列とする、上記に記載の複対立遺伝子 (multiple allele) の組み合わせを表示するものである。

- 5 本発明の早見表は、複対立遺伝子 (multiple allele) の組合せに対応する色素表現型 (pigment phenotype) をも表示するものである。

- また、本発明の早見表は、花色遺伝型交配の組み合わせから花きの花色を決定するものであって、花粉親の配偶子を行とし、種子親の配偶子を列とする、上記
10 に記載の複対立遺伝子 (multiple allele) の組み合わせから花色 (flower color) を表示するものである。

- 本発明の花きとは、フラボノイド (flavonoids) を含む花、果実、種子、葉、すなわち、フラボノイド (flavonoids) を含む花卉、萼片、苞、花被、果皮、種皮、葉柄などを有する顕花植物門 (Anthophyta)
15 の被子植物門 (Angiospermae) であり、被子植物門として双子葉植物綱 (Dicotyledoneae)、単子葉植物綱 (Monocotyledoneae) に関する。

- 双子葉植物綱の合弁花亜綱 (Sympetalae) の花きとして、限定されるものではないが、例えば、キキョウ目 (Campanulatae) (キク科
20 (Compositae)、ステイリディウム科 (Stylidiaceae)、クサトペラ科 (Goodeniaceae)、キキョウ科 (Campanulaceae))、ウリ目 (Cucurbitales) (ウリ科 (Cucurbitaceae))、アカネ目 (Rubiales) (マツムシソウ科 (Dipsacaceae)、オミナエシ科 (Valerianaceae)、スイカズラ科 (Caprifoliaceae)、アカネ科 (Rubiaceae))、シソ目 (Tubiflorae) (キツネノマゴ科 (Acanthaceae)、タヌキモ科 (Lentibulariaceae)、イワタバコ科 (Gesneriaceae)、ツノゴマ科 (Martyniaceae)、ゴマ科 (Pedaliaceae)、ノウゼンカズラ科 (Bignoniaceae)、ゴマノハグサ科 (Scrop

hulariaceae)、ナス科 (Solanaceae)、シソ科 (Labiatae)、クマツヅラ科 (Verbenaceae)、ムラサキ科 (Boraginaceae)、ハゼリソウ科 (Hydrophyllaceae)、ハナシノブ科 (Polemoniaceae)、ヒルガオ科 (Convolvulaceae))、モクセイ目 (Contortae) (ガガイモ科 (Asclepiadaceae)、キョウチクトウ科 (Apocynaceae)、リンドウ科 (Gentianaceae)、フジウツギ科 (Loganiaceae)、モクセイ科 (Oleaceae))、イソマツ目 (Plumbaginales) (イソマツ科 (Plumbaginaceae))、サクラソウ目 (Primulales) (サクラソウ科 (Primulaceae)、ヤブコウジ科 (Myrsinaceae))、ツツジ目 (Ericales) (ツツジ科 (Ericaceae)、イチヤクソウ科 (Pyrolaceae))、イワウメ目 (Diapensiales) (イワウメ科 (Diapensiaceae)) が挙げられる。

双子葉植物綱の離弁花亜綱 (Archichlamydeae) の花きとして、例えば、限定されるものではないが、テンニンカ目 (Myrtiflorae) (アカバナ科 (Onagraceae)、ノボタン科 (Melastomataceae)、フトモモ科 (Myrtaceae)、シクンシ科 (Combretaceae)、ザクロ科 (Punicaceae)、ミソハギ科 (Lythraceae)、グミ科 (Elaeagnaceae)、ジンチョウゲ科 (Thymelaeaceae))、ツバキ目 (Parietales) (シュウカイドウ科 (Begoniaceae)、トケイソウ科 (Passifloraceae)、ハンニチバナ科 (Cistaceae)、スミレ科 (Violaceae)、ツバキ科 (Camelliaceae))、アオイ目 (Malvales) (アオイ科 (Malvaceae)、ホルトノキ科 (Elaeocarpaceae))、クロウメモドキ目 (Rhamnales) (ブドウ科 (Vitaceae)、クロウメモドキ科 (Rhamnaceae))、ムクロジ目 (Sapindales) (ツリフネソウ科 (Balsaminaceae)、トチノキ科 (Hippocastanaceae)、カエデ科 (Aceraceae)、ニシキギ科 (Celastraceae)、モチノキ科 (Aquifoliaceae)、ウルシ科 (Anac

ardiacae)), フウロソウ目 (Geraniales) (トウダイグサ科 (Euphorbiaceae)、ヒメハギ科 (Polygalaceae)、ミカン科 (Rutaceae)、アマ科 (Linaceae)、フウロソウ科 (Geraniaceae)、カタバミ科 (Oxalidaceae)), パラ目 (Rosales) (マメ科 (Leguminosae)、バラ科 (Rosaceae)、マンサク科 (Hamamelidaceae)、トベラ科 (Pittosporaceae)、ユキノシタ科 (Saxifragaceae)、ベンケイソウ科 (Crassulaceae)), サラセニア目 (Sarraceniales) (サラセニア科 (Sarraceniaceae)、ウツボカズラ科 (Nepenthaceae)、モウセンゴケ科 (Droseraceae)), ケシ目 (Papaverales) (アブラナ科 (Brassicaceae)、フウチヨウソウ科 (Capparidaceae)、ケシ科 (Papaveraceae)), キンポウゲ目 (Ranunculales) (クスノキ科 (Lauraceae)、メギ科 (Berberidaceae)、キンポウゲ科 (Ranunculaceae)、アケビ科 (Lardizabalaceae)、スイレン科 (Nymphaeaceae)、パンレイシ科 (Annonaceae)、モクレン科 (Magnoliaceae)), アカザ目 (Centrospermae) (ナデシコ科 (Caryophyllaceae)、オシロイバナ科 (Nyctaginaceae)), タデ目 (Polygonales) (タデ科 (Polygonaceae)), イラクサ目 (Urticales) (クワ科 (Moraceae)), ヤマモモ目 (Myricales) (ヤマモモ科 (Myricaceae)) が挙げられる。

単子葉植物網の花きとして、限定されるものではないが、例えば、ラン目 (Orchidales) (ラン科 (Orchidaceae)), ショウガ目 (Scitamineae) (カンナ科 (Cannaceae)、ショウガ科 (Zingiberaceae)、バショウ科 (Musaceae)), ユリ目 (Liliiflorae) (アヤメ科 (Iridaceae)、ヒガンバナ科 (Amaryllidaceae)、ユリ科 (Liliaceae)), ツユクサ目 (Commelinales) (ミズアオイ科 (Pontederiaceae)、ツユクサ科 (C

ommelinaceae)、パイナップル科 (Bromeliaceae)、サトイモ目 (Arales) (サトイモ科 (Araceae)) が挙げられる。

花色自体の遺伝子型育種法では後代 (progenies) 花色の分離に曖昧なところが多く、実用化することに沢山の問題点を残した。また、非特許文献6
5 に記載のある、 E_1/e_1 および E_2/e_2 で表されたゼラニウム (Pelargonium x hortorum) 色素の遺伝についても、後代の分離比に疑問点があり、実用化には至らなかった。特許文献においては、遺伝子組み替え、照射などによる突然変異を起こさせなければ、新花色を作出することができないという問題がある。さらに、遺伝した個体がどのような花色を有するか予測することが困難であって、その花色も肉眼による曖昧な色であり、問題がある。また、トルコギキョウではできたもののすべての花きに適用できるかどうか、CIELab
10 b表色系 (CIELab color coordinate system) などを用いて花色を正確に測色・数値化し、遺伝させることが十分ではなかったという問題点もある。本発明は、花色素生合成の遺伝を明らかにし、花きの花色をCIELab表色系などを用いて花色を正確に測色・数値化した上で、その色素
15 遺伝子型 (pigment genotype) と花色 (flower color) の関係を明らかにし、花きの新花色作出について実用的花色遺伝型交配法を提供するものである。

本発明により、花きの色素遺伝子型 (pigment genotype) を
20 明らかにできる。たとえば、遺伝子型 (genotype) $D/d \cdot E/e \cdot H^x H^x \cdot P_g/p_g \cdot C_y/c_y \cdot D_p/d_p$ であって、 P_{gn} 、 C_{yn} 、 D_{pn} の色素表現型 (pigment phenotype) を帰属した花色遺伝型交配法を用い、花きの花色をCIELab表色系を用いて正確に測色・数値化することにより、優れた新花色を提供できる。

25

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の花色遺伝型交配法とは、該アントシアニン類 (anthocyanidins) に関する遺伝子型育種法であって、かつフラボノイド生合成 (bi

o synthesis of flavonoids) における前駆化合物の B 環の水酸化に五つの複対立遺伝子 (multiple allele) で表記することのできる花色遺伝型交配法である。

- 本発明において、花きのアントシアニジン生合成の前駆化合物生成について、
- 5 複対立遺伝子 (multiple allele) の組合せが、 $H^T H^F$ 、 $H^T H^D$ 、 $H^T H^Z$ と H^O の場合、B 環 (B-ring) の水酸基 (hydroxyl groups) が 1～3 個有する六種の前駆化合物 (ナリンゲニン (naringenin)、エリオディクチオール (eriodictyol)、ペンタヒドロキシフラバノン (pentahydroxyflavanone)、ジヒドロケン
- 10 フェロール (dihydrokaempferol)、ジヒドロクエルセチン (dihydroquercetin)、ジヒドロミリセチン (dihydromyricetin)) を生成し、 $H^T H^T$ の場合、B 環の水酸基が 1 個と 2 個を有する四種の前駆化合物 (ナリンゲニン (naringenin)、エリオディクチオール (eriodictyol)、ジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol)、ジヒドロクエルセチン (dihydroquercetin)) を生成し、 $H^F H^F$ の場合、B 環の水酸基を 1 個有する二種の前駆化合物 (ナリンゲニン (naringenin)、ジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol)) を生成し、 $H^D H^F$ と $H^D H^D$ の場合、B 環の水酸基を 3 個有する二種の前駆化合物 (ペンタヒドロキシフラバノン (pentahydroxyflavanone)、ジヒドロミリセチン (dihydromyricetin)) を生成し、 $H^D H^Z$ 、 $H^Z H^Z$ の場合、B 環の水酸基が 3 個有する二種の前駆化合物 (ペンタヒドロキシフラバノン (pentahydroxyflavanone)、ジヒドロミリセチン (dihydromyricetin)) を生成する。更に、アントシアニジン生合成酵素 (anthocyanin synthase) レベルにある Pg/pg の遺伝子座 (gene locus) のため、劣性ホモ型 (recessive homozygote) ($pgpg$) を形成した場合には、前駆化合物として、ナリンゲニン (naringenin) およびジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol) を生成しても Pgn を生合成しない。 $H^Z H^F$ の場合、B 環の水酸基を 2～3
- 25

個有する四種の前駆化合物(エリオディクチオール(eriodictyol)、ペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)、ジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)、ジヒドロミリセチン(dihydromyricetin))を生成する。

- 5 すなわち、 H^T の対立遺伝子(allele)は、ナリンゲニン(naringenin)からエリオディクティオール(eriodictyol)並びにジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)への生化学的変換(biosynthetic transformation)を制御し、 H^F の対立遺伝子
- 10 子は、エリオディクティオール(eriodictyol)からペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)並びにジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御する。従って、 H^F の対立遺伝子は、エリオディクティオール(eriodictyol)やジ
- 15 ヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)の前駆化合物が存在しなければ生化学的変換は行われぬ。一方、 H^D の対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)並びにジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御するが、この対立遺伝子は、基質を完全にペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)またはジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)へ変換することが特徴である。更に、 H^Z の対立遺伝子は、ナリンゲニン(naringenin)からペンタヒドロキシフラバノン(pentahydroxyflavanone)並びにジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol)
- 20 からジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)への生化学的変換を制御するが、この対立遺伝子は、一旦基質を完全にエリオディクティオール(eriodictyol)および、ジヒドロクエルセチン(dihydroquercetin)へ変換し、更にこれらをペンタヒドロキシフラバノン(pe
- 25

5 n t a h y d r o x y f l a v a n o n e) および、ジヒドロミリセチン (d i h y d r o m y r i c e t i n) へ変換することが特徴である。従って、H^Fの対立遺伝子と対を組んだ場合、中間体であるエリオディクティオール (e r i o d i c t y o l) および、ジヒドロクエルセチン (d i h y d r o q u e r c e t i n) が基質として奪われ、H^ZH^Fの遺伝子型では、結果としてB環の水酸基を2～3個有する四種の前駆化合物 (エリオディクチオール (e r i o d i c t y o l)、ペンタヒドロキシフラバノン (p e n t a h y d r o x y f l a v a n o n e)、ジヒドロクエルセチン (d i h y d r o q u e r c e t i n)、ジヒドロミリセチン (d i h y d r o m y r i c e t i n)) を生成する。

10 従って、H^DH^D型、H^DH^F型、H^DH^Z型、H^ZH^F型、H^ZH^Z型の場合、P g / p g が優性型 (d o m i n a n t g e n o t y p e) (P g P g または P g p g) であっても、P g n は生成されない。H^Oの対立遺伝子 (a l l e l e) は、ナリングニン (n a r i n g e n i n) からエリオディクティオール (e r i o d i c t y o l) とペンタヒドロキシフラバノン (p e n t a h y d r o x y f l a v a n o n e) 並びにジヒドロケンフェロール (d i h y d r o k a e m p h e r o l) からジヒドロクエルセチン (d i h y d r o q u e r c e t i n) とジヒドロミリセチン (d i h y d r o m y r i c e t i n) への全ての生化学的変換を制御する。

20 本発明において、例えば、トルコギキョウ花卉の色素遺伝子型 (p i g m e n t g e n o t y p e) について、H^TH^FP g - C y C y D p D p、H^TH^DP g - C y C y D p D p、H^TH^ZP g - C y C y D p D p と H^O-P g - C y C y D p D p の遺伝子型 (g e n o t y p e) で P g n C y n D p n 型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e) を得ることができる。H^TH^TP g - C y C y D p D p で P g n C y n 型 (P g n C y n - p h e n o t y p e) を得ることができる。

25 H^TH^Fp g p g C y C y D p D p、H^TH^Dp g p g C y C y D p D p、H^TH^Zp g p g C y C y D p D p と H^O-p g p g C y C y D p D p で C y n D p n (C y n D p n - p h e n o t y p e) 型を得ることができる。H^FH^FP g - C y C y D p D p で P g 型 (P g n - p h e n o t y p e) を得ることができる。H^TH^Tp g p g C y C y D p D p で C y n 型 (C y n - p h e n o t y p e) を

得ることができる。 $H^D H^F$ — $Cy Cy Dp Dp$ 、 $H^D H^Z$ — $Cy Cy Dp Dp$ と $H^D H^D$ — $Cy Cy Dp Dp$ で Dpn 型 (Dpn -phenotype)を得ることができる。 $H^F H^F p g p g Cy Cy Dp Dp$ で白花を得ることができる。また、 Dpn 型の色素表現型 (pigment phenotype) にはメチル化アントシアニジン (methylated anthocyanidins) であるマルヴィジン (malvidin, Mv) とペチュニジン (petunidin, Pt) を含む。更に、 Cyn 型の色素表現型にはメチル化アントシアニジンであるペオニジン (peonidin, Pn) を含む。ここで「白花」とは、アントシアニジン (anthocyanidin) を全く含まない花のことを指す。なお、本発明では、 $PgnDpn$ 型は得られない。また、“—” と表記されているのは、その一つ前に表記された遺伝子 (gene and/or allele) に優性的に支配されていることを示し、いずれの遺伝子 (gene and/or allele) でも用いることができることを意味する。更にまた、“—” と表記されているのは、いずれの遺伝子 (gene and/or allele) も用いることができることを意味する。

本発明において、例えば、トルコギキョウ花卉の色素表現型 (pigment phenotype) について、 $PgnCynDpn$ 型 ($PgnCynDpn$ -phenotype) で、赤紫色、赤色、紫赤色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。 $PgnCyn$ 型 ($PgnCyn$ -phenotype) で、赤色、深赤色、淡赤色、ピンク色の花を得ることができる。 $CynDpn$ 型 ($CynDpn$ -phenotype) で、淡紫色、紫赤色、紫色、青紫色の花を得ることができる。 Pgn 型 (Pgn -phenotype) で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色、クリーム色、白色の花を得ることができる。 Cyn 型 (Cyn -phenotype) で、赤色、淡赤色、ピンク色、白赤色の花を得ることができる。 Dpn 型 (Dpn -phenotype) で、紫色を得ることができる。 $None$ 型 ($H^F H^F p g p g Cy Cy Dp Dp$ の遺伝子型、 $H^F H^F p g p g Cy Cy Dp Dp$ genotype) で白花を得ることができる。

本発明において、例えば、スイートピー (sweet pea, *Lathyrus odoratus*) 花卉の色素遺伝子型 (pigment genotype)

pe) について、 $H^T H^T P g - C y C y D p D p$ で $P g n C y n$ 型 ($P g n C y n - p h e n o t y p e$) を得ることができる。 $H^T H^F p g p g C y C y D p D p$ 、 $H^T H^D p g p g C y C y D p D p$ と $H^O - p g p g C y C y D p D p$ で $C y n D p n$ 型 ($C y n D p n - p h e n o t y p e$) を得ることができる。 $H^T H^T p g p g C y C y D p D p$ で $C y n$ 型 ($C y n - p h e n o t y p e$) を得ることができる。 $H^D H^F - - C y C y D p D p$ と $H^D H^D - - C y C y D p D p$ で $D p n$ 型 ($D p n - p h e n o t y p e$) を得ることができる。 $H^F H^F p g p g C y C y D p D p$ で白花を得ることができる。ここで「白花」とは、アントシアニジンを全く含まない花のことを指す。なお、本発明では、 $P g n D p n$ 型 ($P g n D p n - p h e n o t y p e$) は得られない。また、“-” と表記されているのは、その一つ前に表記された遺伝子 (gene and/or allele) に優性的に支配されていることを示し、いずれの遺伝子 (gene and/or allele) でも用いることができることを意味する。更にまた、“- -” と表記されているのは、いずれの遺伝子 (gene and/or allele) も用いることができることを意味する。

$D p n$ 型 ($D p n - p h e n o t y p e$) の色素表現型 (pigment phenotype) にはメチル化アントシアニン (methylated anthocyanidin) であるマルヴィジン (malvidin、Mv) とペチュニジン (petunidin、Pt) を含むが、これらは、いずれも $D p n$ 型 ($D p n - p h e n o t y p e$) の色素表現型 (pigment phenotype) に包含される。更に、 $C y n$ 型 ($C y n - p h e n o t y p e$) の色素表現型 (pigment phenotype) にはメチル化アントシアニン (methylated anthocyanidin) であるペオニジン (peonidin、Pn) を含むが、これは $C y n$ 型 ($C y n - p h e n o t y p e$) の色素表現型 (pigment phenotype) に包含される。

本発明において、例えば、ツツジおよびシャクナゲ花卉の色素遺伝子型 (pigment genotype) について、 $H^T H^T p g p g C y C y D p D p$ で $C y n$ 型 ($C y n - p h e n o t y p e$) を得ることができる。 $H^T H^F p g p g C y C y D p D p$ 、 $H^T H^O p g p g C y C y D p D p$ 、 $H^O H^O p g p g C y C y$

DpDp、でCynDpn型 (CynDpn-phenotype) を得ることができる。H^FH^Fp g p g CyCyDpDpで白花を得ることができる。ここで

「白花」とは、アントシアニジンを含む花のことを指す。なお、本発明

では、PgnDpn型 (PgnDpn-phenotype) は得られない。ツ

5 ツジ花卉の色素遺伝子型 (pigment genotype) の特徴として、

Pgn色素 (Pgn-phenotype) の生合成 (biosynthesis)

に關与するジヒドロフラボノールリダクターゼ (DFR)、あるいはアント

シアニジンシンターゼ (AS) の発現に關する遺伝子座 (gene locus)

が劣性のホモ型 (recessive homozygote) (p g p g) に

10 なっているために、Pgn色素 (Pgn pigment) が生成されない。

Dpn型 (Dpn-phenotype) の色素表現型 (pigment p

henotype) にはメチル化アントシアニジン (methylated a

nthocyanidin) であるマルヴィジン (malvidin、Mv) と

ペチュニジン (petunidin、Pt) を含むが、これらは、いずれもDp

15 n型 (Dpn-phenotype) の色素表現型 (pigment phen

otype) に包含される。更に、Cyn型 (Cyn-phenotype) の

色素表現型 (pigment phenotype) にはメチル化アントシアニ

ジン (methylated anthocyanidin) であるペオニジン

(peonidin、Pn) を含むが、これらはCyn型 (Cyn-phen

20 otype) の色素表現型 (pigment phenotype) に包含される。

本発明の花色遺伝型交配法は、花きの花卉または萼片、花被、苞、果皮などの

有色部分から、50%酢酸水溶液 (acetic acid solution)、

または50%酢酸メタノール (methanolic-acetic aci

d) を用いてアントシアニン (anthocyanin) を抽出 (extrac

25 t) し (酢酸の濃度 (concentration) は10~50%でも可能で、

酢酸の代わりに0.5~2規定塩酸 (normal hydrochloric

acid solution) を用いても良い)、これを塩酸加水分解して、ア

ントシアニジン (anthocyanidin) を含む加水分解物 (hydro

lysate) を高速液体クロマトグラフィー (High Performan

ce Liquid Chromatography、HPLC) などを用いて各種アントシアニジン进行分析する。自殖 (self-pollination) や交雑を繰り返して得られた後代 (progenies) の遺伝子型 (genotype) について、優性ホモ型 (dominant homozygote)、
5 優性ヘテロ型 (dominant heterozygote)、劣性ホモ型 (recessive homozygote) を決定し、各花色をその遺伝子型 (pigment genotype) より様々な花色を自由自在に作出することのできる交配方法である。

10 実施例

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

花きの花卉、果皮、葉を採集し、花卉および萼片等については、全色系または
15 覆輪系 (八重花を含む) の着色した部分、同色の部分、並びに白色の部分などを切除し、精秤後、試験管 (test tube) 中にて 0.5~2 規定塩酸水溶液 (0.5~2N HCl) などの酸性溶媒 (acidic solution) を加え、アントシアニン色素 (anthocyanins) を抽出 (extract) した。抽出は、文献記載の方法 (Uddin, et al.: J. Jpn.
20 Soc. Hort. Sci., 71:40-47, 2002; Wang, et al.: J. Plant Res., 114:213-221, 2001; 松添直隆、ほか 5 名: 園学雑、68:138-145, 1999) を用いた。抽出液を綿栓濾過 (cotton filtration) 後、濾液 (filtrate) について 95~100℃ で加熱し加水分解 (hydrolysis) を行い、1~
25 6 種のアントシアニジンを含む溶液を得た。加水分解は、文献記載の方法 (Uddin, et al.: J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 71:40-47, 2002) を用いた。反応後、溶液 (reaction mixture) をメンブランフィルター (membrane filter) で濾過後、濾液 (filtrate) について HPLC 装置にて分析した。HPLC の分析条件およ

び分析装置は、文献記載の方法 (Uddin, et al.: J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 71: 40-47, 2002) を用いた。

HPLCクロマトチャート (chromatographic chart) から、3種のアントシアニジン (anthocyanidin)、すなわち、それ
5 ぞれのアントシアニジンのピークを占有面積として算出し、ペラルゴニジン (pelargonidin, Pgn)、シアニジン (cyanidin, Cyn)、デルフィニジン (delphinidin, Dpn)、並びに3種のメチル化アントシアニジン、すなわち、ペオニジン (peonidin, Pn)、ペチュニジン (petunidin, Pt) およびマルヴィジン (malvidin, Mv) の全ピーク面積 (peak area) を100%とした。得られた固有
10 ピークからアントシアニジンについて、その花の色素遺伝子型 (pigment genotype) を決定した。

花きの花卉、果皮、葉を採集し、花卉および萼片等については、全色系または
15 覆輪系 (いずれも八重花を含む) の着色した部分、同色の部分、並びに白色の部分などを切除し、色彩計 (colorimeter) を用いて花色を測定した。表色系は、CIELab表色系を用い、測定条件および測定装置は、文献記載の方法 (Wang, et al.: J. Plant Res., 114: 33-43, 2001) を用いた。

トルコギキョウ (lisanthus; Eustoma属) (リンドウ科、
20 Gentianaceae) のロイヤルバイオレット (Royal Violet) (CynDpn色素表現型、CynDpn-phenotype)、ミッキーローズ (Micky Rose) (PgnCynDpn色素表現型、PgnCynDpn-phenotype)、および、あすかの紅 (Asuka no Kurenai) (PgnCyn色素表現型、PgnCyn-phenotype)
25 の3品種 (F_1 世代、 F_1 -generation) を用いて、自殖 (self-pollination) による S_1 世代 (S_1 -generation) の分離を調べ、その結果を表1 (Table 1) に示した。また同様に、ロイヤルバイオレット (Royal Violet) (CynDpn色素表現型、CynDpn-phenotype)、ミッキーローズ (Micky Rose) (Pgn

CynDpn色素表現型、PgnCynDpn-phenotype)、および
 あすかの紅 (Asuka no Kurenai) (PgnCyn色素表現型、
 PgnCyn-phenotype) の3品種 (F₁世代、F₁-generation)
 5 5を用いて、2品種間の正逆交雑 (cross-pollination)
 によるF₁世代 (F₁-generation) の分離を調べ、その結果を表2に
 示した。その結果、ロイヤルバイオレット (CynDpn色素表現型)、ミッキ
 ーローズ (PgnCynDpn色素表現型)、および、あすかの紅 (PgnCy
 n色素表現型) の、色素遺伝子型 (pigment genotype) を決定
 した。

10

表 1

S ₁ アントシアニジン の色素表現型	観察値	S ₁ 世代の 色素遺伝子型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
ミッキーローズ (ddeeH ^T H ^F PpggCyCyDpDp色素遺伝型) (F ₁) の自殖による分離、合計130個体					
PgnCynDpn	62	ddeeH ^T H ^F Pg- CyCyDpDp	6	11.887	0.036
PgnCyn	28	ddeeH ^T H ^T Pg- CyCyDpDp	3		
CynDpn	15	ddeeH ^T H ^F pgpgCyCyDpDp	2		
Pgn	19	ddeeH ^F H ^F Pg- CyCyDpDp	3		
Cyn	3	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	1		
none	3	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	1		
ロイヤルバイオレット (ddeeH ^O H ^D pgpgCyCyDpDp色素遺伝型) (F ₁) の自殖による分離、合計183個体					
CynDpn	138	ddeeH ^O -pgpgCyCyDpDp	3	0.164*	0.898
Dpn	45	ddeeH ^D H ^D pgpgCyCyDpDp	1		
あすかの紅 (ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp色素遺伝型) (F ₁) の自殖による分離、合計142個体					
PgnCyn	142	ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp	1		1.000

表 2

F ₁ アントシアニジンの色素表現型	観察値	F ₁ 世代の色素遺伝子型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
ミッキーローズ (ddeeH ^T H ^F PgpgCyCyDpDp) とロイヤルバイオレット (ddeeH ^O H ^D PgpgCyCyDpDp) の正逆交雑、計160個体					
PgnCynDpn	52	ddeeH ^O -Pg- CyCyDpDp と ddeeH ^T H ^D Pg- CyCyDpDp	3	1.842*	0.398
CynDpn	63	ddeeH ^O -pgpgCyCyDpDp と ddeeH ^T H ^D PgpgCyCyDpDp	3		
Dpn	45	ddeeH ^D H ^F -- CyCyDpDp	2		
ロイヤルバイオレット (ddeeH ^O H ^D PgpgCyCyDpDp) とあすかの紅 (ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp) の正逆交雑、計137個体					
PgnCynDpn	137	ddeeH ^O H ^T PgpgCyCyDpDp と ddeeH ^D H ^T PgpgCyCyDpDp	1	-	1.000
あすかの紅 (ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp) とミッキーローズ (ddeeH ^T H ^F PgpgCyCyDpDp) の正逆交雑、計208個体					
PgnCynDpn	103	ddeeH ^T H ^F Pg- CyCyDpDp	1	0.019*	0.890
PgnCyn	105	ddeeH ^T H ^T Pg- CyCyDpDp	1		

表1および表2から、ロイヤルバイオレット (Royal Violet) は
 5 ddeeH^OH^DPgpgCyCyDpDpの色素遺伝子型 (pigment genotype) であり、ミッキーローズ (Micky Rose) はddeeH^TH^FPgpgCyCyDpDpの色素遺伝子型 (pigment genotype) であり、あすかの紅 (Asuka no Kurenai) はddeeH^TH^TPgPgCyCyDpDpの色素遺伝子型 (pigment genotype) であることがわかる。また、花色は、ロイヤルバイオレットは紫色、ミ
 10 ッキーローズは赤紫色、あすかの紅は赤色であった。なお、表1中none色素表現型 (none-pigment phenotype) は、白花を示す。

実施例3

トルコギキョウ (lisanthus) の表3に示すS₁世代 (S₁-generation) を親株として、これらを自殖 (self-pollination) し、分離したS₂世代 (S₂-generation) を調べ、各種系統 (lines) の色素遺伝子型 (pigment genotype) を決定した。
 15 その結果を表3に示した。

表 3

アントシアニジンの 色素表現型	観察値	色素遺伝子型	期待値 (分離比)	χ^2 -検定値 *P<0.05	適合値
G2D3B27E (ddeeH ^T H ^F pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂) の自殖による後代の分離					
CynDpn	22	ddeeH ^T H ^F pgpgCyCyDpDp	2	1.811 *	0.404
Cyn	9	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	1		
none	6	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	1		
G2D3B29A (ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
Pgn	24	ddeeH ^F H ^F Pg- CyCyDpDp	3	0.771 *	0.380
none	11	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	1		
G2D3B25F (ddeeH ^F H ^F PgPgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
Pgn	76	ddeeH ^F H ^F PgPgCyCyDpDp	1	-	1.000
G2D3B27Y (ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂) の自殖による後代の分離					
Cyn	12	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	1	-	1.000
G2D3B26B (ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
none	31	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	1	-	1.000
J5A2H16B (ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
CynDpn	22	ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp	1	-	1.000
J5A2H13CE (ddeeH ^O H ^D pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
CynDpn	39	ddeeH ^O -pgpgCyCyDpDp	3	0.491 *	0.484
Dpn	16	ddeeH ^D H ^D pgpgCyCyDpDp	1		
J5A2H110C1A (ddeeH ^D H ^D pgpgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
Dpn	24	ddeeH ^D H ^D pgpgCyCyDpDp	1	-	1.000
W1C3B111Y (ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp)系統 (F ₂ およびF ₃) の自殖による後代の分離					
PgnCyn	56	ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp	1	-	1.000

- 5 表3から分かるように、ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) からPgn色素 (Pgn-pigment) のみを有する色素表現型 (pigment phenotype) として、G2D3B25F系統 (line) (白色、赤白色、クリーム色、またはピンク色の花) を得た。ddeeH^TH^TpgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) からCyn色素 (Cyn-pigment) の
- 10

5 みを有する色素表現型 (pigment phenotype) として、G2D3B27Y系統 (line) (赤白色、またはピンク色の花) を得た。ddeeH^FH^FpgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) から色素を全く有しないnone型 (none-phenotype) として、G2D3B26B系統 (白花) を得た。ddeeH⁰H⁰pgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) からCynDpn色素 (CynDpn-pigment) を有する色素表現型 (pigment phenotype) として、J5A2H16B系統 (赤紫色の花) を得た。ddeeH^DH^DpgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) からDpn色素 (Dpn-pigment) のみを有する色素表現型 (pigment phenotype) として、J5A2H110C1A系統 (紫色の花) を得た。ddeeH^TH^TPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype) からPgnCyn色素 (PgnCyn-pigment) を有する色素表現型 (pigment phenotype) として、W1C3B111Y系統 (line) (赤色の花) を得た。これらは、いずれも純系 (pure line) (優性または劣性のホモ型) であることがわかる。

実施例 4

20 Pgn型 (Pgn-phenotype) で赤白色の花 (G2D3B25F系統 (line)、ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype)) とCyn型 (Cyn-phenotype) で赤白色の花 (G2D3B27Y系統 (line)、ddeeH^TH^TpgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype)) を正逆交雑 (cross-pollination) したところ、PgnCynDpn型 (PgnCynDpn-phenotype) の赤紫色の花 (ddeeH^TH^FPgpgCyCyDpDp色素遺伝子型 (pigment genotype)) が得られた。色素遺伝子型 (pigment-genotype) を想定した非特許文献6 (小林加奈: 育種学雑誌、48:169-176、1998) の方法では、PgnCyn型 (PgnCyn-phenotype) の花が得られると

記載されており、P g n C y n D p n 型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e) の赤紫色の花が分離したことは説明が付かない。

実施例 5

P g n C y n 型 (P g n C y n - p h e n o t y p e) で赤色の花 (W 1 C 3
5 B 1 1 1 Y 系統 (l i n e)、d d e e H^T H^T P g P g C y C y D p D p 色素遺
伝子型 (p i g m e n t g e n o t y p e)) と白花 (n o n e 型 (n o n e
- p h e n o t y p e)、d d e e H^F H^F p g p g C y C y D p D p 色素遺伝子
型 (p i g m e n t g e n o t y p e)) を正逆交雑 (c r o s s - p o l l i
i n a t i o n) したところ、P g n C y n D p n 型 (P g n C y n D p n - p
10 h e n o t y p e) の赤紫色の花が得られた。色素遺伝子型 (p i g m e n t -
g e n o t y p e) を想定した非特許文献 6 (小林加奈：育種学雑誌、48：1
69-176、1998) の方法では、P g n C y n 型 (P g n C y n - p h e
n o t y p e) の花が得られると記載されており、P g n C y n D p n 型 (P g
n C y n D p n - p h e n o t y p e) の赤紫色の花が分離したことは説明が付
15 かない。

実施例 6

トルコギキョウ (l i s i a n t h u s) の品種 (c u l t i v a r)、ブラ
イダルバイオレット (B r i d a l V i o l e t) (覆輪花、F₁ 系統 (F₁ l
i n e)) を自殖 (s e l f - p o l l i n a t i o n) し、その花色分離を調
20 査した。その結果、表 4 に示すように、全て覆輪の優性型として後代が得られ、
色素遺伝子型 (p i g m e n t g e n o t y p e) と花色 (f l o w e r c
o l o r a t i o n) を決定した。系統 F 3 I 1 A 2 D 1 D は覆輪の優性形質の
遺伝子型 (ホモ型) を有する白花である。

表 4

系統名	個体数	7-ヒドロキシ色素の組成			色素遺伝子型	CIELab表色系による花色		
		Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
F3I1A2D1 (F ₁) の自殖 (χ ² -検定値, 1.322; 適合値, 0.723)								
F3I1A2D1A	35	-	5.8	94.2	ddEEH ^Z H ^F Pg - CyCyDpDp	35.5	53.2	-28.1
F3I1A2D1B	15	-	-	100	ddEEH ^Z H ^Z Pg - CyCyDpDp	34.4	53.3	-28.3
F3I1A2D1C	9	100	-	-	ddEEH ^F H ^F Pg - CyCyDpDp	74.6	18.3	13.7
F3I1A2D1D	3	-	-	-	ddEEH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	82.7	9.3	91.7

実施例 5 A

- 5 トルコギキョウ (*l i s i a n t h u s*) の G 4 I 5 A 3 I 1 F 4 (CynD
pn色素表現型 (CynDpn-phenotype)、赤紫色の花)、A 1 3 B
1 B 3 I 4 (Pg nCyn色素表現型 (Pg nCyn-phenotype)、
赤色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 3 (Pg nCyn色素表現型 (Pg nCyn
-phenotype)、赤色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 A (Cyn色素表現
10 型 (Cyn-phenotype)、赤色の花)、I 5 A 2 1 I 3 F 1 2 (Dpn
色素表現型 (Dpn-phenotype)、紫赤色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C
3 6 (Pg n色素表現型 (Pg n-phenotype)、白黄色の花)、G 2 D
3 B 2 I 5 C 3 7 (none色素表現型 (none-phenotype)、白
花) の 7 系統について、自殖 (self-pollination) による後代
15 1 8 0 個体の分離を調べ、その結果を表 5 に示した。

表 5

系統名	個体数	アントシアニン色素の組成			色素遺伝子型	CIE Lab表色系による花色		
		Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
G4I5A3I1F4	34	-	66.9	30.8	ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp	64.0	34.6	-31.0
A1C3B1B3I4	96	92.1	7.7	-	ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp	40.6	56.4	-4.7
G2D3B2I5C33	8	98.4	1.6	-	ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp	60.6	29.4	-4.3
G2D3B2I5C3A	1	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	46.4	48.2	-10.7
I5A2H1I3F12	13	-	-	100	ddeeH ^D H ^D pgpgCyCyDpDp	25.1	77.7	-28.8
G2D3B2I5C36	23	100	-	-	ddeeH ^F H ^F PgPgCyCyDpDp	86.4	6.5	88.3
G2D3B2I5C37	5	-	-	-	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	87.0	10.7	114.2

表5のように、それぞれの系統 (lines) は親株と同一の色素組成 (pigment constitution)、色素遺伝子型 (pigment-genotype)、花色 (flower color) であった。なお、各系統の個体数を除いた各数値は、系統毎の個体数に対する平均値である。色素遺伝子型 (pigment-genotype) は、いずれもホモ型であった。G4I5A3I1F4とI5A2I1I3F12の2系統は、色素組成 (pigment constitution) と遺伝子型 (genotype) が違うにも関わらず、色相角 (h、hue angle) は、-31.0と-28.8度で同様な値を示し、その花色は赤紫色方向の色であった。A1C3B1B3I4とG2D3B2I5C33の2系統は、系統が違ったにも関わらず、同様な色相角 (h、hue angle) (-4.7と-4.3度) を与え、その花色は、赤色方向の色であった。しかし、A1C3B1B3I4系統は、鮮やかさ (chroma) を示すC*の値がG2D3B2I5C33系統に比べ、ほぼ2倍の56.4の値を与え、濃い赤色の花であった。

一方、G2D3B2I5C33系統は淡い赤色の花であった。G2D3B2I5C36 (Pgn色素型) の色相角 (h、hue angle) は、88.3度を示し、黄色方向の色であった。このC*の値は6.5と低い値を示し、鮮やかさ (chroma) は小さい値であった。したがって、花卉にアントシアニン色素 (anthocyanin) が含まれているにも関わらず、肉眼ではクリーム

色の花として確認された。白花であるG 2 D 3 B 2 I 5 C 3 7系統の色相角は1 1 4. 2度を与え、緑黄色方向の色であった。このC*の値は1 0. 7と低い値を示したため、肉眼では、非常に白色の花に近い、しかし、淡い緑黄色の花として確認された。

5 実施例 6 A

トルコギキョウ (*l i s i a n t h u s*) のG 2 D 3 B 2 I 5 C 3 1 (P g n C y n D p n色素表現型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e)、赤紫色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 2 (P g n C y n D p n色素表現型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e)、赤色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 4 (P g n C y n色素表現型 (P g n C y n - p h e n o t y p e)、赤橙色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 5 (P g n色素表現型 (P g n - p h e n o t y p e)、白赤色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 8 (C y n D p n色素表現型 (C y n D p n - p h e n o t y p e)、白色の花)、G 2 D 3 B 2 I 5 C 3 9 (C y n D p n色素表現型 (C y n D p n - p h e n o t y p e)、赤紫色の花)、I 5 A 2 1 I 3 F 1 1 (C y n D p n色素表現型 (C y n D p n - p h e n o t y p e)、紫赤色の花)、A 1 C 3 B 1 B 3 I M A (P g n C y n D p n色素表現型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e)、赤紫色の花)、A 1 C 3 B 1 B 3 I M B (P g n C y n色素表現型 (P g n C y n - p h e n o t y p e)、赤色の花)、I 5 A 2 1 I 3 F M A (P g n C y n D p n色素表現型 (P g n C y n D p n - p h e n o t y p e)、紫色の花)、I 5 A 2 1 I 3 F M B (C y n D p n色素表現型 (C y n D p n - p h e n o t y p e)、紫色の花)、I 5 A 2 1 I 3 F M C (D p n色素表現型 (D p n - p h e n o t y p e)、紫色の花) の12系統 (l i n e s) 298個体について、色素組成 (p i g m e n t c o n s t i t u t i o n)、色素遺伝子型 (p i g m e n t - g e n o t y p e)、花色 (f l o w e r c o l o r a t i o n) を調べ、その結果を表6に示した。

表 6

系統名	個体数	アントシアニン色素の組成			色素遺伝子型	CIE Lab表色系による花色		
		Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
G2D3B2I5C31	32	26.0	67.8	3.9	ddeeH ^T H ^F Pg - CyCyDpDp	51.8	37.8	-18.7
G2D3B2I5C32	5	20.5	72.5	2.6	ddeeH ^T H ^F Pg - CyCyDpDp	78.8	6.5	28.6
G2D3B2I5C34	9	34.7	64.1	-	ddeeH ^T H ^T Pg - CyCyDpDp	80.4	7.8	55.8
G2D3B2I5C35	4	100	-	-	ddeeH ^F H ^F Pg - CyCyDpDp	63.3	23.5	4.4
G2D3B2I5C38	4	-	82.3	15.6	ddeeH ^T H ^F pgpgCyCyDpDp	84.6	8.5	97.5
G2D3B2I5C39	7	-	79.7	17.7	ddeeH ^T H ^F pgpgCyCyDpDp	54.0	34.6	-22.1
I5A2H1I3F11	31	-	7.6	90.7	ddeeH ^O H ^D pgpgCyCyDpDp と ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp	25.0	76.3	-28.0
A1C3B1B3IMA	46	38.2	67.3	2.8	ddeeH ^T H ^F Pg - CyCyDpDp	53.5	45.4	-18.4
A1C3B1B3IMB	46	88.6	11.4	-	ddeeH ^T H ^T Pg - CyCyDpDp	66.7	32.5	-8.0
I5A2H1I3FMA	42	1.3	11.7	85.5	ddeeH ^T H ^D Pg - CyCyDpDp と ddeeH ^O H ^X Pg - CyCyDpDp	30.0	75.2	-32.0
I5A2H1I3FMB	43	-	8.4	90.5	ddeeH ^T H ^D pgpgCyCyDpDp と ddeeH ^O H ^X pgpgCyCyDpDp	30.3	75.2	-32.5
I5A2H1I3FMC	39	-	-	100	ddeeH ^D H ^F - - CyCyDpDp	32.4	71.6	-34.0

- 表6のように、それぞれの系統の色素遺伝子型は、いずれもヘテロ型であった。なお、各系統の個体数を除いた各数値は、系統毎の個体数に対する平均値である。
- 5 G2D3B2I5C31 (Pg n Cy n Dp n 色素型、赤紫色の花)、A1C3B1B3IMA (Pg n Cy n Dp n 色素型、赤紫色の花) の2系統のアントシアニン色素組成、花色は、共に同様の値を示し、色素遺伝子型は同じであった。一方、G2D3B2I5C32 (Pg n Cy n Dp n 色素表現型、赤色の花) の系統は、G2D3B2I5C31、A1C3B1B3IMA系統と同様な色素遺伝子型と色素組成を示したにも関わらず、色相角が28.6度を与え、赤橙色の方向の色を示した。しかし、このC*の値は6.5と低い値であったことから、肉眼による花色は薄い赤色がかった白色の花であった。Pg n Cy n 色素表現型を有するG2D3B2I5C34とA1C3B1B3IMBの2系統は同一の色素遺伝子型を有していたが、色素組成と花色は全く異なっていた。すなわち、
- 10 G2D3B2I5C34は色相角が55.8度で橙色方向の色(肉眼では白色に近いオレンジ色の花)を示したのに対して、A1C3B1B3IMBは色相角が
- 15

8. 0度の赤色方向の色（肉眼では赤色の花）であった。CynDpn色素表現型を有するG2D3B2I5C38とG2D3B2I5C39の2系統は同一の色素遺伝子型を有していたが、色素組成と花色は全く異なっていた。すなわち、G2D3B2I5C38は色相角が97.5度で黄色方向の色（肉眼では白色に近い黄色の花）を示したのに対して、G2D3B2I5C39は色相角が-22.1度の赤色方向の色（肉眼では赤色の花）であった。H⁰、またはH^Dの複対立遺伝子を含むI5A2H1I3F11、I5A2H1I3FMA、I5A2H1I3FMB、I5A2H1I3FMCの4系統は、いずれも色相角が-20度を下回り、紫赤色方向の色を示し、肉眼では紫色の花であった。

10 実施例7

以下、トルコギキョウF₁種子の交配作出法を具体的に説明する。

Cyn色素表現型の一重全色ピンク色の花(ddeeH^TH^TpgpgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)とPgn色素表現型の一重全色白色の花(ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn色素表現型の一重全色赤紫色の花(ddeeH^TH^FPgpgCyCyDpDp色素遺伝子型、ヘテロ型)を得た。

CynDpn色素表現型の一重全色赤紫色の花(ddeeH⁰H⁰pgpgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)とPgn色素表現型の一重全色白色の花(ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn色素表現型の一重全色赤紫中間色の花(ddeeH⁰H^FPgpgCyCyDpDp色素遺伝子型、ヘテロ型)を得た。

PgnCyn色素表現型の一重全色赤色の花(ddeeH^TH^TPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)とPgn色素表現型の一重全色白色の花(ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型、ホモ型)を交配し、PgnCynDpn色素表現型の一重全色ピンク中間色の花(ddeeH^TH^FPgpgCyCyDpDp色素遺伝子型、ヘテロ型)を得た。

トルコギキョウのG2D3B2I5C36(Pgn色素表現型、ddeeH^FH^FPgPgCyCyDpDp色素遺伝子型、白黄色の花)とG4I5A3I1F4(CynDpn色素表現型、ddeeH⁰H⁰pgpgCyCyDpDp色素

遺伝子型、赤紫色の花) (表 5) を用いて正逆交雑することにより、より赤い花
 を作出する計画により交配を行った。この交配より、 F_1 種子の花として G 2 D
 3 G 4 I 5 系統 (16 個体) を得た。この色素表現型は全て、P g n C y n D p
 n 色素表現型 (P g 24. 7%、C y 72. 4%、D p 2. 9%) で、
 5 d d e e H⁰ H^F P g p g C y C y D p D p の色素遺伝子型であった。また、花色は
 肉眼では赤紫色であった。花色は、色相角 (h) が -18. 5 度で赤紫色方向の
 色であった。明度 L* 値は 61. 9 の値で G 4 I 5 A 3 I 1 F 4 系統と同様に花
 色は明るく、彩度 C* 値は 40. 7 の値で、やや鮮やかな赤紫色の花であった。
 したがって、G 4 I 5 A 3 I 1 F 4 系統にはない P g n 色素表現型を G 2 D 3 B
 10 2 I 5 C 3 6 系統を用いて、それに P g n 色素を組みことができ、G 4 I 5 A 3
 I 1 F 4 系統よりも、より赤い花を計画の通り作出することができた。

実施例 8

トルコギキョウの P g n C y n 色素表現型の A 1 C 3 B 1 B 3 I 系統 (色素遺
 伝子型は d d e e H^T H^T P g P g C y C y D p D p) と C y n D p n 色素表現型
 15 I 5 A 2 H 1 I 3 F 系統 (色素遺伝子型は d d e e H⁰ H^D p g p g C y C y D p
 D p) を用いて、正逆交雑による後代の分離を調べ、その結果を表 7 に示した。
 その結果、A 1 C 3 B 1 B 3 I 系統を種子親、I 5 A 2 H 1 I 3 F 系統を花粉親
 として交配した場合、A 1 C 3 B 1 B 3 I R A 系統と A 1 C 3 B 1 B 3 I R B 系
 統を 1 : 1 の分離比で得、これらの色素遺伝子型と花色を決定した。A 1 C 3 B
 20 1 B 3 I R A 系統は P g n 色素を主体とし、色相角は -8. 0 度を与え、花色は
 赤色方向の色であった。彩度を示す C* 値が 33. 3 で、淡い赤色の花であった。
 また、A 1 C 3 B 1 B 3 I R B 系統は C y n 色素を主体とし、色相角は -18.
 9 度を与え、花色は赤色の紫がかかる方向の色であった。彩度を示す C* 値が 47.
 1 で、赤色の花であった。

25 一方、I 5 A 2 H 1 I 3 F 系統を種子親、A 1 C 3 B 1 B 3 I 系統を花粉親と
 して交配した場合、I 5 A 2 H 1 I 3 F A S 系統を 79 個体得、その色素遺伝子
 型と花色を決定した。色相角は -30. 2 度を与え、花色は紫赤色方向の色であ
 った。

表 7

系統名	個体数	アントシアジン色素の組成			色素遺伝子型	CIE Lab表色系による花色		
		Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
A1C3B1B3I	1	95.0	5.0	-	ddeeH ^T H ^T PgPgCyCyDpDp	65.2	29.5	-5.3
I5A2H1I3F	1	-	4.0	96.0	ddeeH ^O H ^D PgPgCyCyDpDp	24.6	75.7	-29.4

A1C3B1B3I (種子親) x I5A2H1I3F (花粉親)								
A1C3B1B3IRA	29	91.6	6.0	2.4	ddeeH ^T H ^D PgPgCyCyDpDp	65.8	33.3	-8.0
A1C3B1B3IRB	29	33.3	64.6	2.1	ddeeH ^T H ^O PgPgCyCyDpDp	52.2	47.1	-18.9

I5A2H1I3F (種子親) x A1C3B1B3I (花粉親)								
I5A2H1I3FAS	79	0.5	9.6	89.8	ddeeH ^D H ^T PgPgCyCyDpDp と ddeeH ^O H ^T PgPgCyCyDpDp	27.4	76.3	-30.2

- 表 7 の結果から、A 1 C 3 B 1 B 3 I 系統と I 5 A 2 H 1 I 3 F 系統の間には、
- 5 色素生合成が核遺伝する他に、細胞質遺伝（特に、母性遺伝）による花色遺伝があることがわかる。この遺伝を利用することにより、色素の核遺伝子型を損なうことなく、母親株に近い花色を出すことができた。

実施例 9

- トルコギキョウの A 4 B 3 F 2 K 2 (F₂、八重花)、G 2 D 3 B 2 I 5 9 A (F₃)、G 4 H 5 G 2 D 3 9 A (F₂) の各系統を自殖した結果を表 8 に示す。A 4 B 3 F 2 K 2 (F₂) 系統は、色素遺伝子型はホモ型であり、花色はほぼ 3 : 1 で分離した。G 2 D 3 B 2 I 5 9 A (F₃) 系統と G 4 H 5 G 2 D 3 9 A (F₂) からは、色素遺伝子型に従い、花色が分離した。この結果、A 4 B 3 F 2 K 2 (F₂) の自殖系統のように、同一の遺伝子型からも違った花色が分離することがわ
- 15 かる。

表 8

系統名	個体数	アントシアニン色素の組成			色素遺伝子型	CIE Lab表色系による花色		
		Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
A4B3F2K2 (F ₂) の自殖 (χ ² -検定値, 2.564; 適合値, 0.109)								
A4B3F2K21	34	100	-	-	DDeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	68.7	33.6	-6.2
A4B3F2K22	18	100	-	-	DDeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	88.8	7.1	104.5

G2D3B2I59A (F ₃) の自殖 (χ ² -検定値, 0.961; 適合値, 0.327)								
G2D3B2I59A1	11	100	-	-	ddeeH ^F H ^F Pg - CyCyDpDp	88.1	8.1	98.4
G2D3B2I59A2	6	-	-	-	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp	89.3	8.6	105.2

G4H5G2D39A (F ₂) の自殖 (χ ² -検定値, 12.18; 適合値, 0.0005)								
G4H5G2D39A1	10	18.3	75.2	6.5	ddeeH ^O H ^O Pg - CyCyDpDp	63.0	39.4	-20.1
G4H5G2D39A2	13	-	84.6	16.6	ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp	71.8	28.3	-26.2

実施例 10

- 5 八重花（多弁花）のトルコギキョウを自殖し、八重花と一重花が84個体：30個体（3：1）で分離した。その結果、八重花の遺伝子型を、D/dで示すことができる。D/dは英語の八重花（double flower）の頭文字を取り、それぞれ優性型／劣性型を示す。表記方法は他の頭文字を取っても、同一である。従って、DDとDd遺伝子型では八重花が得られ、dd遺伝子型では一重の花が得られた。八重花には、バラ咲き（rose）八重花とフリル咲き（frill）八重花があり、遺伝子型D_r/dおよびD_f/dでそれぞれが得られた。
- 10

実施例 11

- 覆輪花（花卉の先端のみが着色した花）のトルコギキョウを自殖し、覆輪花と全色花（花卉全てが着色した花）が229個体：77個体（3：1）で分離した。
- 15 その結果、覆輪の遺伝子型を、E/eで示すことができる。E/eは英語の覆輪花（edge colored）の頭文字を取り、それぞれ優性型／劣性型を示す。表記方法は他の頭文字を取っても、同一である。従って、EEとEe遺伝子型では覆輪花が得られ、ee遺伝子型では全色の花が得られた。

実施例 12

スイトピー（マメ科）花卉色素の分析を行い、各品種系統の花弁色素遺伝子型を調べた。その結果、表 9 に示すように、各品種系統の花弁色素遺伝子型を明らかにした。D p n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるマルヴィジン (malvidin、Mv) とペチュニジン (petunidin、Pt) を含み、これらは、いずれも D p n を生成する色素遺伝子型に包含される。更に、C y n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるペオニジン (peonidin、Pn) を含み、C y n を生成する色素遺伝子型に包含した。

表 9

系統	個体数	アントシアニン色素の組成						色素遺伝子型
		Pg (%)	Cy (%)	Pn (%)	Dp (%)	Pt (%)	Mv (%)	
紫色系品種	5	-	-	-	5.0	18.4	76.6	ddeeH ^D H ^D -- CyCyDpDp
青紫色系品種	7	-	4.4	1.4	24.9	21.9	47.4	ddeeH ^T H ^D pgpgCyCyDpDp
赤色系品種	8	-	44.8	55.2	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp
淡赤色系品種	17	54.8	20.2	25.0	-	-	-	ddeeH ^T H ^T Pg - CyCyDpDp
白色系品種	3	-	-	-	-	-	-	ddeeH ^F H ^F pgpgCyCyDpDp

実施例 13

シャクナゲ（ツツジ科）花卉の色素の分析を行い、各品種系統の花弁色素遺伝子型を調べた。その結果、表 10 に示すように、各品種系統の花弁色素遺伝子型を明らかにした。D p n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるマルヴィジン (malvidin、Mv) とペチュニジン (petunidin、Pt) を含み、これらは、いずれも D p n を生成する色素遺伝子型に包含される。更に、C y n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるペオニジン (peonidin、Pn) を含み、C y n を生成する色素遺伝子型に包含した。

表 1 0

系統	個体数	アントシアニン色素の組成						色素遺伝子型
		Pg (%)	Cy (%)	Pn (%)	Dp (%)	Pt (%)	Mv (%)	
紫色系品種	15	-	51.1	9.6	13.5	3.3	22.9	ddeeH ^O H ^O pgpgCyCyDpDp
赤色系品種	15	-	98.1	1.9	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp

実施例 1 4

- 5 ツツジ (ツツジ科) 花卉の色素の分析を行い、各品種の花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、表 1 1 に示すように、各品種系統の花卉色素遺伝子型と花色を明らかにした。D p n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるマルヴィジン (malvidin、Mv) とペチュニジン (petunidin、Pt) を含む場合があり、これらは、いずれも D p n を生成する色素遺伝子型に包含される。
- 10 更に、C y n の色素表現型にはメチル化アントシアニンであるペオニジン (peonidin、Pn) を含む場合があり、C y n を生成する色素遺伝子型に包含した。

表 1 1

品種名	アントシアニン色素の組成 (%)						色素遺伝子型	花色 (CIELab表色)		
	Pg	Cy	Pn	Dp	Pt	Mv		L*	C*	h
キンモウツツジ	-	90.3	9.7	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	54.9	60.7	27.5
ヒラドツツジ 曙	-	53.0	10.6	28.5	+	7.9	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	74.8	31.0	-15.7
ヒラドツツジ 御代の栄	-	87.7	12.3	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	74.4	38.2	-13.0
ヒラドツツジ 朱赤	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	55.1	62.0	18.5
ヒラドツツジ 大紫	-	27.0	16.0	12.5	5.7	38.8	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	54.7	59.8	-23.2
ヒラドツツジ 白妙	-	68.6	-	31.4	-	-	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	90.8	4.7	103.4

実施例 1 5

キンモウツツジを種子親に、ヒラドツツジを花粉親として交配を行い、F₁ ツツジを作出し、それらの花卉色素の分析を行い、種子親と花粉親、各雑種の色素

遺伝子型と花色遺伝を調べた。その結果、表12に示すように、各雑種個体群における色素遺伝子型と花色を明らかにした。D p nの色素表現型にはメチル化アントシアニンであるマルヴィジン (malvidin、Mv) とペチュニジン (petunidin、Pt) を含む場合があり、これらは、いずれもD p nを生成する色素遺伝子型に包含される。更に、C y nの色素表現型にはメチル化アントシアニンであるペオニジン (peonidin、Pn) を含み、C y nを生成する色素遺伝子型に包含した。

表 1 2

系統名	個体数	アントシアニン色素の組成 (%)						色素遺伝子型	花色 (CIE Lab表色)		
		Pg	Cy	Pn	Dp	Pt	Mv		L*	C*	h
キンモクツヅ (種子親) x ヒラドツヅ 曙 (花粉親)											
KiAke97MA	8	-	21.9	5.8	27.2	11.1	33.9	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	54.4	55.0	2.7
KiAke97mB	6	-	32.3	-	67.7	-	-	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	54.2	54.0	5.7
KiAke97Ma	12	-	54.9	45.1	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	57.6	57.8	2.2
KiAke97mb	3	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	58.9	55.8	17.1
キンモクツヅ (種子親) x ヒラドツヅ 御代の栄 (花粉親)											
KiMiy97M1	33	-	75.4	24.6	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	66.8	43.4	9.8
KiMiy97m2	27	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	81.3	15.5	12.8
キンモクツヅ (種子親) x ヒラドツヅ 朱赤 (花粉親)											
KiShu97M1	22	-	68.9	31.1	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	56.1	58.7	17.3
KiShu97m2	4	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	58.1	56.6	18.9
キンモクツヅ (種子親) x ヒラドツヅ 大紫 (花粉親)											
KiOom97MA	6	-	22.2	6.4	20.5	11.2	39.8	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	55.9	54.8	-3.5
KiOom97mB	3	-	29.9	-	70.1	-	-	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	57.9	53.6	-0.8
KiOom97Ma	7	-	48.2	51.8	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	58.2	57.6	6.3
KiOom97mb	3	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	61.3	53.6	7.6
キンモクツヅ (種子親) x ヒラドツヅ 白妙 (花粉親)											
KiSir97MA	5	-	27.2	10.0	16.1	10.4	36.3	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	56.8	55.2	-5.2
KiSir97mB	4	-	33.5	-	66.5	-	-	ddeeH ^O H ^T pgpgCyCyDpDp	57.5	52.8	3.5
KiSir97Ma	4	-	65.9	34.1	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	60.9	53.8	7.6
KiSir97mb	1	-	100	-	-	-	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	60.2	54.6	15.8

- 二重咲き花（ホーズインホーズ；h o s e - i n - h o s e）の久留米ツツジと一重花サツキを交配し、二重咲き花雑種と一重花雑種が144個体：123個体（1：1）で分離した。その結果、二重咲き花久留米ツツジおよび二重咲き花雑種の、二重咲き形質に関する遺伝子型をD_hd（ヘテロ型）と明らかにし、一重花サツキおよび一重花雑種の遺伝子型がdd（劣性ホモ型）で有ることがわかる。

実施例17

ツバキ（ツバキ科）について、花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、表13に示すように、各品種の花弁色素遺伝子型と花色がわかる。

10

表13

品種名	アントシアニン色素の組成			色素遺伝子型	CIELab表色系による花色		
	Pg (%)	Cy (%)	Dp (%)		L*	C*	h
トウツバキ	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	64.0	40.4	-0.7
ピタールツバキ	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	58.0	52.3	3.1
宛田紅花油茶	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	50.3	58.4	11.8
ヤブツバキ 尖閣	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	38.6	59.6	10.5
ヤブツバキ 玉の浦	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	42.0	60.0	11.6
ハウザンツバキ	-	100	-	ddeeH ^T H ^T pgpgCyCyDpDp	41.2	63.7	13.1

実施例18

- バラ（バラ科）の品種‘フレンチヤム’について、花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、アントシアニジンはCyn色素表現型であり、D-e e H^TH^TpgpgCyCyDpDpの色素遺伝子型であることがわかる。

実施例19

- デルフィニウム（キンポウゲ科）の品種‘ブルーミラー’について、萼片色素遺伝子型を調べた。その結果、アントシアニジンはDpn色素表現型であり、ddeeH^DH^DpgpgCyCyDpDpの色素遺伝子型であることがわかる。

実施例20

カーネーション（ナデシコ科）の品種‘クラレットエレガンス’、‘サリスローヤレッド’、‘ソルビックスシドニー’、‘ミス小倉’、‘福岡78号’

について、花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、これら品種のアントシアニジンは全て $P g n C y n$ 色素表現型であり、 $D - e e H^T H^T P g - C y C y D p D p$ の色素遺伝子型であることがわかる。

実施例 2 1

- 5 グラジオラス（アヤメ科）の品種‘紅雀’、‘アーリーレッド’、‘レッドラジアンズ’、‘美園’、‘バンドワゴン’について、花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、これら品種のアントシアニジンは全て $P g n$ 色素表現型であり、 $d d e e H^F H^F P g - C y C y D p D p$ の色素遺伝子型であることがわかる。

実施例 2 2

- 10 赤色系品種のキク（キク科）について、花卉色素遺伝子型を調べた。その結果、本品種のアントシアニジンは $C y n$ 色素表現型であり、 $d d e e H^T H^T p g p g C y C y D p D p$ の色素遺伝子型であることがわかる。

実施例 2 3

- 各複対立遺伝子の組合せ早見表を、表 1 4 および表 1 5 に示す。行には花粉親の配偶子を示し、列には種子親の配偶子を示す。表 1 4 は、 $P g / p g$ 、 $C y / c y$ および $D p / d p$ で示される遺伝子座が $P g P g C y C y D p D p$ または $P g p g C y C y D p D p$ で表される場合の組合せ表であり、表 1 5 は、 $P g / p g$ 、 $C y / c y$ および $D p / d p$ で示される遺伝子座が $p g p g C y C y D p D p$ で表される場合の組合せ表である。例えば、遺伝子座が $P g P g C y C y D p D p$ であり、一つの複対立遺伝子 H^0 ともう一つの複対立遺伝子 H^0 が受精し、その組合せが $H^0 H^0$ となった場合は、表 1 4 からその色素表現型が $P g n C y n D p n$ であることが、この早見表より速やかに知ることができる。

表 1 4

PpPpCyCyDpDp または PpPpCyCyDpDp の遺伝子座の場合						
♂	♀	HO	HD	HZ	HT	HF
HO	HOHO PgnCynDpn	HOHD PgnCynDpn	HOHZ PgnCynDpn	HOHT PgnCynDpn	HOHF PgnCynDpn	
HD	HDHO PgnCynDpn	HDHD Dpn	HDHZ Dpn	HDHT PgnCynDpn	HDHF Dpn	
HZ	HZHO PgnCynDpn	HZHD Dpn	HZHZ Dpn	HZHT PgnCynDpn	HZHF CynDpn	
HT	HTHO PgnCynDpn	HTHD PgnCynDpn	HTHZ PgnCynDpn	HTHT PgnCyn	HTHF PgnCynDpn	
HF	HFHO PgnCynDpn	HFHD Dpn	HFHZ CynDpn	HFHT PgnCynDpn	HFHF Pgn	

表 1 5

PpPpCyCyDpDp の遺伝子座の場合						
♂	♀	HO	HD	HZ	HT	HF
♀	HO	HOHO CynDpn	HOHD CynDpn	HOHZ CynDpn	HOHT CynDpn	HOHF CynDpn
	HD	HDHO CynDpn	HDHD Dpn	HDHZ Dpn	HDHT CynDpn	HDHF Dpn
	HZ	HZHO CynDpn	HZHD Dpn	HZHZ Dpn	HZHT CynDpn	HZHF CynDpn
	HT	HTHO CynDpn	HTHD CynDpn	HTHZ CynDpn	HTHT Cyn	HTHF CynDpn
	HF	HFHO CynDpn	HFHD Dpn	HFHZ CynDpn	HFHT CynDpn	HFHF none

実施例 2 4

色素表現型と色素遺伝子型との対応を示す、早見表を表 1 6 に示す。例えば、
 P g n C y n 色素型の $H^T H^T P g P g C y C y D p D p$ の色素遺伝子型と、白花
 (none 色素型) の $H^F H^F p g p g C y C y D p D p$ の色素遺伝子型とを交配
 5 すると、 $H^T H^F P g p g C y C y D p D p$ の色素遺伝子型を有する F_1 交配種を
 作出することができ、その色素表現型が P g n C y n D p n であることが、この
 早見表より速やかに知ることができる。

表 1 6

色素表現型	色素遺伝子型	色素表現型	色素遺伝子型
PgnCynDpn	$H^O H^O P g P g C y C y D p D p$	Dpn	$H^D H^D P g P g C y C y D p D p$
	$H^O H^O P g p g C y C y D p D p$		$H^D H^D P g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^D P g P g C y C y D p D p$		$H^D H^D p g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^D P g p g C y C y D p D p$		$H^D H^Z P g P g C y C y D p D p$
	$H^O H^Z P g P g C y C y D p D p$		$H^D H^Z P g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^Z P g p g C y C y D p D p$		$H^D H^Z p g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^T P g P g C y C y D p D p$		$H^D H^F P g P g C y C y D p D p$
	$H^O H^T P g p g C y C y D p D p$		$H^D H^F P g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^F P g P g C y C y D p D p$		$H^D H^F p g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^F P g p g C y C y D p D p$		$H^Z H^Z P g P g C y C y D p D p$
	$H^D H^T P g P g C y C y D p D p$		$H^Z H^Z P g p g C y C y D p D p$
	$H^D H^T P g p g C y C y D p D p$		$H^Z H^Z p g p g C y C y D p D p$
	$H^Z H^T P g P g C y C y D p D p$	PgnCyn	$H^T H^T P g P g C y C y D p D p$
	$H^Z H^T P g p g C y C y D p D p$		$H^T H^T P g p g C y C y D p D p$
	$H^T H^F P g P g C y C y D p D p$	Cyn	$H^T H^T p g p g C y C y D p D p$
	$H^T H^F P g p g C y C y D p D p$		
CynDpn	$H^O H^O p g p g C y C y D p D p$	Pgn	$H^F H^F P g P g C y C y D p D p$
	$H^O H^D p g p g C y C y D p D p$		$H^F H^F P g p g C y C y D p D p$
	$H^O H^Z p g p g C y C y D p D p$	none (white)	
	$H^O H^T p g p g C y C y D p D p$		
	$H^O H^F p g p g C y C y D p D p$		
	$H^D H^T p g p g C y C y D p D p$		
	$H^Z H^T p g p g C y C y D p D p$		
	$H^Z H^F P g P g C y C y D p D p$		
	$H^Z H^F P g p g C y C y D p D p$		
	$H^T H^F p g p g C y C y D p D p$		

実施例 2 5

各複対立遺伝子の組合せから花色を知ることのできる早見表を、表 1 7 および

- 表18に示す。行には花粉親の配偶子を示し、列には種子親の配偶子を示す。表17は、 Pg/pg 、 Cy/cy および Dp/dp で示される遺伝子座が $PgPgCyCyDpDp$ または $PgpgCyCyDpDp$ で表される場合の組合せ表であり、表18は、 Pg/pg 、 Cy/cy および Dp/dp で示される遺伝子座が $pgpgCyCyDpDp$ で表される場合の組合せ表である。例えば、遺伝子座が $PgPgCyCyDpDp$ であり、一つの複対立遺伝子 H^O ともう一つの複対立遺伝子 H^O が受精し、その組合せが $H^O H^O$ となった場合は、表17からその色素表現型は $PgnCynDpn$ であり、したがって、その花色が赤紫色であることをこの早見表より速やかに知ることができる。

10

表17

PgPgCyCyDpDp または PgpgCyCyDpDp の遺伝子座の場合						
♀ +	♂ ↑	(H ^O)	(H ^D)	(H ^Z)	(H ^T)	(H ^F)
(H ^O)		H ^O H ^O Pg n Cyn Dpn 赤紫色	H ^O H ^D Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^O H ^Z Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^O H ^T Pg n Cyn Dpn 赤紫色	H ^O H ^F Pg n Cyn Dpn 赤紫色
(H ^D)		H ^D H ^O Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^D H ^D Dpn 紫色	H ^D H ^Z Dpn 紫色	H ^D H ^T Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^D H ^F Dpn 紫色
(H ^Z)		H ^Z H ^O Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^Z H ^D Dpn 紫色	H ^Z H ^Z Dpn 紫色	H ^Z H ^T Pg n Cyn Dpn 紫色	H ^Z H ^F Cyn Dpn 紫色
(H ^T)		H ^T H ^O Pg n Cyn Dpn 赤紫色	H ^T H ^D Pg n Cyn Dpn 紫赤色	H ^T H ^Z Pg n Cyn Dpn 紫色	H ^T H ^T Pg n Cyn 赤色	H ^T H ^F Pg n Cyn Dpn 赤紫色
(H ^F)		H ^F H ^O Pg n Cyn Dpn 赤紫色	H ^F H ^D Dpn 紫色	H ^F H ^Z Cyn Dpn 紫色	H ^F H ^T Pg n Cyn Dpn 赤紫色	H ^F H ^F Pg n 赤色

表 1 8

PpPgCyCyDpDp の遺伝子座の場合							
		♂	H ^O	H ^D	H ^Z	H ^T	H ^F
♀	+	H ^O	H ^O H ^O CynDpn 赤紫色	H ^O H ^D CynDpn 紫赤色	H ^O H ^Z CynDpn 紫赤色	H ^O H ^T CynDpn 赤紫色	H ^O H ^F CynDpn 赤紫色
	H ^D	H ^D H ^O CynDpn 紫赤色	H ^D H ^D Dpn 紫色	H ^D H ^Z Dpn 紫色	H ^D H ^T CynDpn 紫赤色	H ^D H ^F Dpn 紫色	
	H ^Z	H ^Z H ^O CynDpn 紫赤色	H ^Z H ^D Dpn 紫色	H ^Z H ^Z Dpn 紫色	H ^Z H ^T CynDpn 紫赤色	H ^Z H ^F CynDpn 紫色	
	H ^T	H ^T H ^O CynDpn 赤紫色	H ^T H ^D CynDpn 紫赤色	H ^T H ^Z CynDpn 紫赤色	H ^T H ^T Cyn 赤色	H ^T H ^F CynDpn 赤紫色	
	H ^F	H ^F H ^O CynDpn 赤紫色	H ^F H ^D Dpn 紫色	H ^F H ^Z CynDpn 紫色	H ^F H ^T CynDpn 赤紫色	H ^F H ^F none 白色	

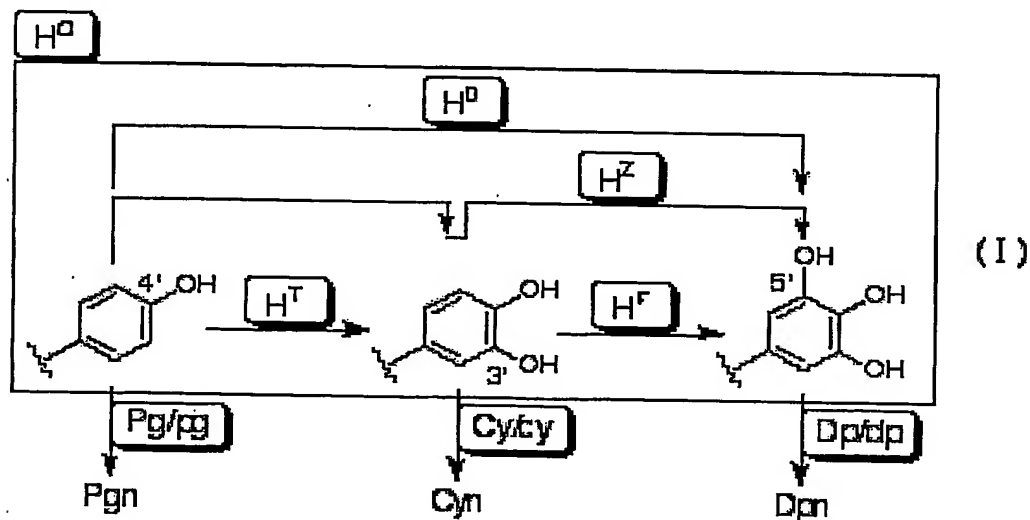
- 5 これらの実施例から、本発明の遺伝子型 $H^X H^X \cdot P g / p g \cdot C y / c y \cdot D p / d p$ または遺伝子型 $D / d \cdot E / e \cdot H^X H^X \cdot P g / p g \cdot C y / c y \cdot D p / d p$ で $P g n$ 、 $C y n$ 、 $D p n$ の色素表現型を帰属した花色および/または花形育種法が優れた花色遺伝型交配法であることは明らかである。

10 産業上の利用可能性

- 本発明により、花きの色素遺伝子型 (pigment genotype) を明らかにできる。たとえば、遺伝子型 (genotype) $D / d \cdot E / e \cdot H^X H^X \cdot P g / p g \cdot C y / c y \cdot D p / d p$ であって、 $P g n$ 、 $C y n$ 、 $D p n$ の色素表現型 (pigment phenotype) を帰属した花色遺伝型交配法を用い、花きの花色を C I E L a b 表色系を用いて正確に測色・数値化することにより、優れた新花色を提供できる。

請求の範囲

- 1 花きの花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン (P g n)、シアニン (C y n)、デルフィニン (D p n) の遺伝であって、遺伝子
 5 型 $H^X H^X \cdot P g / p g \cdot C y / c y \cdot D p / d p$ を用い、新花色を作出する花色遺伝型交配法。
- 2 花きの花色発現に関わる主要アントシアニン色素のペラルゴニン (P g n)、シアニン (C y n)、デルフィニン (D p n) の遺伝並びに花形に関わ
 る八重型、覆輪型の遺伝であって、遺伝子型 $D / d \cdot E / e \cdot H^X H^X \cdot P g / p g \cdot C y / c y \cdot D p / d p$ を用い、新花色を作出する花色遺伝型交配法。
 10
- 3 花色遺伝型が経路式 (I)



- (ここで、 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O は、フラボノイド生合成の前駆物質でのB
 環の水酸化に関する複対立遺伝子を表す。 H^T 、 H^F 、 H^D 、 H^Z 、 H^O の5つの複
 15 対立遺伝子は、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ ($F 3' H$) とフラボノイ
 ド3'、5'-ヒドロキシラーゼ ($F 3'、5' H$) の、それぞれ3'位の水酸化、
 5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、3'、5'位の水酸化、および3'
 位と3'、5'位の水酸化を制御する。この5つの複対立遺伝子の表記方法は、
 例えば、T、F、D、Z、Oなど他の表記法でもよい。 $P g / p g$ 、 $C y / c y$
 20 および $D p / d p$ は、 $P g n$ 、 $C y n$ 、 $D p n$ の生合成に関与するジヒドロフラ

ポノールリダクターゼ (DFR)、あるいはアントシアニンシンターゼ (AS) の発現に対立する遺伝子座がそれぞれに存在することを示し、D/d は八重の花冠形質、E/e は覆輪の花冠形質を示す。)

のフラボノイド生合成に関与し、遺伝する請求の範囲第 1 項記載の花色遺伝型交配法。

4 花きの花色がフラボノイド生合成過程で遺伝する請求の範囲第 1 項に記載の花色遺伝型交配法。

5 花きの花色がフラボノイド生合成過程で遺伝する請求の範囲第 2 項に記載の花色遺伝型交配法。

10 6 花きの花色がフラボノイド生合成過程で遺伝する請求の範囲第 3 項に記載の花色遺伝型交配法。

7 花きの花色が母性遺伝する請求の範囲第 1 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の花色遺伝型交配法。

15 8 花色を作出する花色遺伝型交配の組み合わせを決定するものであって、花粉親の配偶子を行とし、種子親の配偶子を列とする、請求の範囲第 1 項～第 7 項のいずれか 1 項に記載の複対立遺伝子の組み合わせ早見表。

9 花色遺伝型交配の組み合わせから花きの花色を決定するものであって、花粉親の配偶子を行とし、種子親の配偶子を列とする、請求の範囲第 1 項～第 7 項のいずれか 1 項に記載の複対立遺伝子の組み合わせから花色を知ることのできる早見表。

20 10 請求の範囲第 8 項に記載の複対立遺伝子の組み合わせ早見表を新花色を作出する花色遺伝型交配に使用する方法。

11 請求の範囲第 9 項に記載の複対立遺伝子の組み合わせ早見表を新花色を作出する花色遺伝型交配に使用する方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01H1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01H1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTplus, BIOSIS, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Fumio HASHIMOTO et al., "Torukokikyo Kaben no Flavonoid Suisanka no Fukutairitsu Iden to Hanairo", Journal of the Horticultural Association of Japan Bessatsu, Vol.72 (No.2), page 212, 20 September, 2003 (20.09.03)	1-7,10,11
P,A	Takako MATSUMOTO et al., "Torukokikyo no Shikiso Iden to Hanairo Ikushu (2)", Journal of the Horticultural Association of Japan Bessatsu, Vol.72, (No.2), page 210, 20 September, 2003 (20.09.03)	1-7,10,11
A	Takako MATSUMOTO et al., "Torukokikyo no Authocy anidine Shikiso to Hanairo Iden", Journal of the Horticultural Association of Japan Bessatsu, Vol.71 (No.2), page 197 (2002)	1-7,10,11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 March, 2004 (22.03.04)

Date of mailing of the international search report
06 April, 2004 (06.04.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000297

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8, 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 8 and 9 provide simplified chart showing combinations of flower color genotypes and thus pertain to mere presentation of information. Therefore, these claims relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000297

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(v) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 A01H 1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 A01H 1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTplus, BIOSIS, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	橋本文雄ら, トルコギキョウ花卉のフラボノイド水酸化の複対立遺伝と花色. 園芸学雑誌別冊, 第72巻 (第2号), 第212頁 (20.09.2003)	1-7, 10, 11
PA	松本貴子ら, トルコギキョウの色素遺伝と花色育種 (2). 園芸学雑誌別冊, 第72巻 (第2号), 第210頁 (20.09.2003)	1-7, 10, 11
A	松本貴子ら, トルコギキョウのアントシアニン色素と花色遺伝. 園芸学雑誌別冊, 第71巻 (第2号), 第197頁 (2002)	1-7, 10, 11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.03.2004

国際調査報告の発送日

06.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4 N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 9 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 8, 9 は、花色遺伝型の組み合わせを掲載した早見表であって、情報の単なる開示に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(v)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。